HAL
open science

Rôle de la microglie dans la neurogenèse adulte, dans le bulbe olfactif de la souris

Marie Denizet

To cite this version:

Marie Denizet. Rôle de la microglie dans la neurogenèse adulte, dans le bulbe olfactif de la souris. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066391 . tel-01580958

HAL Id: tel-01580958

https://theses.hal.science/tel-01580958v1

Submitted on 4 Sep 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

École doctorale Cerveau, Cognition, Comportement
Laboratoire « Gènes, Synapses et Cognition », CNRS UMR-3571
Laboratoire Perception et Mémoire

Rôle de la microglie dans la neurogenèse adulte, dans le bulbe olfactif de la souris

par Marie Denizet

Thèse de doctorat en neurosciences

Dirigée par Françoise Lazarini

Soutenue publiquement le 2 septembre 2016 en présence de :

Prof. Fabrice Chrétien	Rapporteur
Dr Natacha Teissier	Rapporteur
Dr Alain Bessis	Examinateur
Dr François Boussin	Examinateur
Prof. Pierre-Olivier Couraud	Examinateur
Dr Pierre-Marie Lledo	Examinateur
Prof. Danielle Seilhean	Examinatrice
Dr Françoise Lazarini	Directrice de thèse

Résumé

La cellule microgliale, seule cellule du système immunitaire résidant en permanence dans le système nerveux central, a un rôle important dans le développement cérébral. Elle participe à l'élagage des neurones en développement, *via* le marquage des épines dendritiques à éliminer par les facteurs du complément.

Certaines régions cérébrales continuent à produire des neurones à l'âge adulte. Chez le rongeur, des néo-neurones sont ainsi générés dans la zone sous-ventriculaire tout au long de la vie et migrent vers le bulbe olfactif où ils s'intègrent au réseau pré-existant.

Le but de ce travail est de **caractériser l'implication de la microglie dans le développement et l'élagage des neurones nés dans le système olfactif de la souris à l'âge adulte**.

Pour ce faire, nous avons combiné des **méthodes d'étude du comportement, d'immunohistochimie, de microscopie confocale et d'analyse d'images** pour explorer les **interactions entre microglie et neurones bulbaires dans un contexte normal ou pathologique** : déafférentation olfactive, inflammation par les lipopolysaccharides (LPS) bactériens, dérégulation de l'axe hypothalamus-pituitaire-adrénal ou déficience génétique en complément C3 ($C3^{-/-}$).

Nous avons découvert que la microglie phagocyte préférentiellement les néo-neurones nés à l'âge adulte par rapport aux neurones néonataux, et que cette tendance s'accentue encore en cas de déafférentation sensorielle. Ainsi, la microglie façonne le réseau neuronal du bulbe en fonction des expériences sensorielles. La densité d'épines dendritiques est peu impactée par l'activation microgliale, et n'est pas modifiée par l'absence de complément C3. Cela suggère que **l'élagage des néo-neurones du bulbe olfactif pourrait ne pas mettre en jeu la microglie et le complément C3**.

En conclusion, ce travail de thèse montre l'**importance de la microglie dans la régulation du taux de neurogenèse bulbaire en fonction de l'activité sensorielle.** L'implication de la microglie dans les mécanismes de plasticité neuronale ouvre des perspectives de recherche pour des thérapies ciblées sur les cellules microgliales.

Mots clefs :

microglie, neurogenèse adulte, bulbe olfactif, arbre dendritique, épines dendritiques, olfaction, déafférentation, inflammation, dépression, plasticité, interneurones.

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement Natacha Teissier et Fabrice Chrétien d'avoir accepté de relire ma thèse et d'y avoir apporté des commentaires éclairés. Un grand merci également à Danielle Seilhean, Alain Bessis, François Boussin et Pierre-Olivier Couraud d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Merci particulièrement à Alain Bessis et Fabrice Chrétien, qui ont patiemment suivi ma progression durant ma thèse, et ont suggéré des pistes de recherche pertinentes.

Merci à Pierre-Marie Lledo de m'avoir accueillie dans l'équipe pendant ces 3 ans de thèse, de m'avoir suivie et conseillée. Un grand merci à Françoise Lazarini pour ses conseils techniques et théoriques et son soutien au quotidien.

Merci bien sûr à tous les membres passés et présents du laboratoire, pour leurs conseils, leurs réponses patientes à mes questions, leur aide et leur expertise technique, ou encore leurs relectures éclairées : dans le désordre Carine, Laurent, Mariana, Gabriel, Aleksandra, Ben, Matt, Kurt, Eleni, Gilles, Camille, Antoine, Lida, Damien, Shirin, Anne, Soham, Aroldo, Chantal, Sarah. Je remercie également Elena, Justine, Soham et Audrey, qui ont contribué le temps de quelques semaines aux travaux de cette thèse. Sans oublier Chantal, Colette et Corinne pour leur contribution quotidienne au bon fonctionnement du laboratoire. Merci enfin à Jean-Yves Tinevez pour l'aide lors des longues sessions d'acquisition à la plateforme d'imagerie, à tous les animaliers et au personnel administratif qui travaille dans l'ombre pour la gloire de la rechercher pasteurienne. Merci également à Sébastien pour l'aide technique sur Linux et Python. J'aimerais d'ailleurs mettre l'accent sur la contribution remarquable de mon ordinateur qui, malgré des débuts difficiles, m'a été fidèle durant toute ma thèse. Je remercie également David pour le modèle, et Jean-Baptiste pour le débuggage du fichier LaTeX : sans eux ce manuscrit serait nettement moins beau.

Merci à Ophélie pour toutes les pauses thé, qui ont été si souvent salvatrices pour notre moral à toutes les deux ! Plus généralement, merci à tous les thésards du département de neurosciences avec qui j'ai partagé le bateau : Baptiste, Marion, Coralie, Anaïs, Lauriane, Allain-Thibeault, Fani, Solène, Célia, Alice, Emilienne, Elise et Menelik.

Je n'oublie pas les professeurs du département de biologie de l'ÉNS, et en particulier Michel Volovitch et Mariano Casado, sans le soutien de qui je n'aurais peut être pas

obtenu ma bourse de thèse. Dans la catégorie du financement des études, je suis toujours reconnaissante au CPE du Lycée du Parc, qui a harcelé par téléphone le CROUS à ma place pour m'obtenir une bourse.

Le meilleur pour la fin. J'aimerais remercier toutes les personnes qui ont fait de ces trois années de thèse ce qu'elles ont été, parce qu'il n'y a pas que la thèse dans la vie. La famille bien sûr, présente en filigrane malgré la distance. Un grand merci aux amis d'hier et d'aujourd'hui, d'ici et d'ailleurs, que je ne vais pas citer par peur d'en oublier mais qui se reconnaîtront. Merci enfin à Fathi, sans qui ces années de thèse auraient été beaucoup moins lumineuses.

Table des matières

I Introduction **1**

I.A Microglie . . . 1

I.A.1 Petit historique . . . 1

I.A.2 Origine de la microglie . . . 3

I.A.2.a Origine embryonnaire . . . 3

I.A.2.b Origine à l'âge adulte . . . 4

I.A.2.b.i En conditions homéostatiques . . . 4

I.A.2.b.ii Origine en conditions pathologiques . . . 5

I.A.3 Marqueurs moléculaires de la microglie . . . 6

I.A.3.a Microglie et macrophages . . . 6

I.A.3.b Polarisation de la microglie . . . 7

I.A.3.b.i Polarisation M1 . . . 7

I.A.3.b.ii Polarisation M2 . . . 8

I.A.4 Hétérogénéité de la microglie . . . 9

I.A.4.a Répartition de la microglie . . . 9

I.A.4.b Morphologie de la microglie . . . 9

I.A.5 Fonctions de la microglie . . . 10

I.A.5.a Fonctions macrophagiques . . . 10

I.A.5.a.i En conditions physiologiques . . . 11

I.A.5.a.ii Fonctions de la microglie en cas d'infection . . . 11

I.A.5.a.iii Fonctions de la microglie en cas d'inflammation 12

I.A.5.b Fonctions développementales de la microglie . . . 14

I.A.5.b.i Pendant le développement . . . 14

I.A.5.b.ii Fonctions développementales de la microglie dans le cerveau adulte . . . 18

I.A.6 Implication du complément . . . 18

I.A.6.a La cascade du complément . . . 18

I.A.6.b Complément et neuroinflammation . . . 19

I.A.6.c Le complément dans le développement cérébral . . . 21

I.A.6.d Le complément dans la neurogenèse adulte . . . 21

I.B Olfaction et bulbe olfactif . . . 22

I.B.1 De l'odeur au bulbe olfactif 22
I.B.1.a Les molécules odorantes 22
I.B.1.b Les récepteurs aux molécules odorantes 22
I.B.2 Réseau neuronal du bulbe olfactif 23
I.B.3 Projections du bulbe olfactif 26
I.B.4 Projections vers le bulbe olfactif 28
I.B.4.a Fibres centrifuges neuromodulatrices 28
I.B.4.b Fibres centrifuges corticales 29
I.C Neurogenèse adulte 30
I.C.1 Petit historique 30
I.C.2 Rappels sur la neurogenèse embryonnaire 30
I.C.3 Les niches neurogéniques dans le cerveau adulte des rongeurs . . 32
I.C.3.a Hypothalamus 32
I.C.3.b Gyrus dentelé de l'hippocampe 32
I.C.3.c Zone sous-ventriculaire 33
I.C.4 Migration des néo-neurones bulbaires 36
I.C.4.a Migration tangentielle 36
I.C.4.b Migration radiale 38
I.C.5 Différentiation et intégration des néo-neurones bulbaires 39
I.C.5.a Acquisition de la morphologie 39
I.C.5.b Intégration dans le réseau bulbaire 39
I.C.6 Effets de l'environnement sur les néo-neurones 41
I.C.6.a Influence de l'entrée sensorielle 41
I.C.6.b Influence des projections corticales 43
I.C.6.c Influence de l'inflammation 44
I.C.6.d Influence des états mentaux 46
I.C.6.e Influence des maladies neurodégénératives 47
I.C.7 Neurogenèse adulte chez l'être humain 49
I.D Problématique 50
I.E Modèles et méthodes utilisés 50
I.E.1 Inflammation et modulation de l'activité bulbaire 50
I.E.1.a Déafférentation olfactive 50
I.E.1.b LPS 51
I.E.1.c Anti-inflammatoire 53
I.E.1.d Souris $C3^{-/-}$ 53
I.E.2 Marqueurs de la microglie 54
I.E.3 Effets sur les néo-neurones 54
I.E.3.a Marquage des néo-neurones du bulbe olfactif 54
I.E.3.b Morphologie des néo-neurones 54
I.E.4 Tests comportementaux 54

I.E.4.a Olfaction 55
I.E.4.a.i Test de la Nourriture Cachée 55
I.E.4.a.ii Test d'habituation - déshabituation olfactive . 55
I.E.4.b Anxiété / dépression 56
I.E.4.b.i *Open Field* 56
I.E.4.b.ii *Novelty Suppressed Feeding* 56
I.E.4.b.iii *Splash Test* 56
I.E.4.c Locomotion : Rotarod 56
I.E.4.d Mémoire de travail : reconnaissance d'objet 57

II Résultats **59**

II.A Premier article : Denizet et al., *Sensory deprivation increases phagocytosis of adult-born neurons by activated microglia in the olfactory bulb* . 59
II.A.1 Contexte 59
II.A.2 Résumé 59
II.A.3 Article 61
II.B Deuxième article : Siopi et al., *Anxiety- and Depression-Like States Lead to Pronounced Olfactory Deficits and Impaired Adult Neurogenesis in Mice* 80
II.B.1 Contexte 80
II.B.2 Résumé 80
II.B.3 Article 81
II.C Résultats non publiés : étude de la neurogenèse adulte chez les souris C3$^{-/-}$ 96
II.C.1 Étude comportementale 96
II.C.1.a Souris C3$^{-/-}$ adultes : moins anxieuses, plus sensibles au LPS que les contrôles immunocompétents 96
II.C.1.a.i Anxiété 97
II.C.1.a.ii *Sickness Behavior* 97
II.C.1.a.iii Olfaction 97
II.C.1.a.iv Locomotion 99
II.C.1.b Souris âgées : moins anxieuses 99
II.C.1.b.i Anxiété 99
II.C.1.b.ii Locomotion 100
II.C.1.b.iii Olfaction, cognition 101
II.C.2 Étude histologique 101
II.C.3 Élagage 101
II.C.3.a L'arbre dendritique des souris C3$^{-/-}$ est normal 102
II.C.3.b Épines dendritiques 103

III Discussion **109**
III.A Phagocytose des néo-neurones par la microglie 109
III.B Rôle de la microglie dans le remodelage de l'arbre dendritique 110
III.C Rôle de la microglie dans l'élagage des épines dendritiques des néo-neurones 112
III.D Phénotype des souris C3KO 113
III.E Applicabilité de nos résultats à l'espèce humaine 115
III.E.1 Le modèle murin 115
III.E.2 Choix du sexe 115
III.E.3 Conditions d'élevage des souris 116
III.E.4 Neurogenèse adulte et olfaction 116
III.E.5 Applications à des pathologies humaines 117

IV Conclusion générale et perspectives **119**

Glossaire **123**

Bibliographie **135**

Liste des figures

I.1 La microglie par del Río Hortega 1
I.2 Évolution de la recherche sur la microglie. 2
I.3 Origine et lignage des cellules immunitaires 3
I.4 Marqueurs moléculaires de la microglie 6
I.5 Polarisation de la microglie 7
I.6 Morphologies de la microglie 10
I.7 Fonctions physiologiques de la microglie. 15
I.8 Cascade du complément 20
I.9 Organisation schématique de l'épithélium olfactif. 24
I.10 Réseau schématique du bulbe olfactif adulte 25
I.11 Cortex olfactif 27
I.12 Neurogenèse dans le gyrus dentelé de l'hippocampe 33
I.13 Neurogenèse dans la zone sous-ventriculaire 34
I.14 Sous-régions de la zone sous-ventriculaires 36
I.15 Migration dans le courant de migration rostrale 38
I.16 Schéma d'une cellule granulaire et ses connexions 40
I.17 Effets du dichlobénil. 51
I.18 Diffusion du LPS inoculé intra-nasalement 52
I.19 Activation microgliale suite au LPS 53
I.20 Principe du test de la Nourriture Cachée 55
I.21 Habituation - déhabituation olfactive 55
I.22 Test du Rotarod 56
I.23 Reconnaissance d'objet 57

II.1 Décours temporel des expériences de comportement 96
II.2 Test *Novelty Suppressed Feeding* chez les souris contrôles et $C3^{-/-}$ . . . 97
II.3 Anhédonie des souris $C3^{-/-}$ suite au LPS 98
II.4 Olfaction des souris $C3^{-/-}$ 98
II.5 Décours temporel des expériences de comportement sur les vieilles souris 100
II.6 Comportement de vieilles souris en *Open Field* 100
II.7 Décours temporel de l'analyse de la morphologie des néo-neurones . . . 102
II.8 Évolution de la complexité dendritique des néo-neurones de 3 à 6 semaines 103

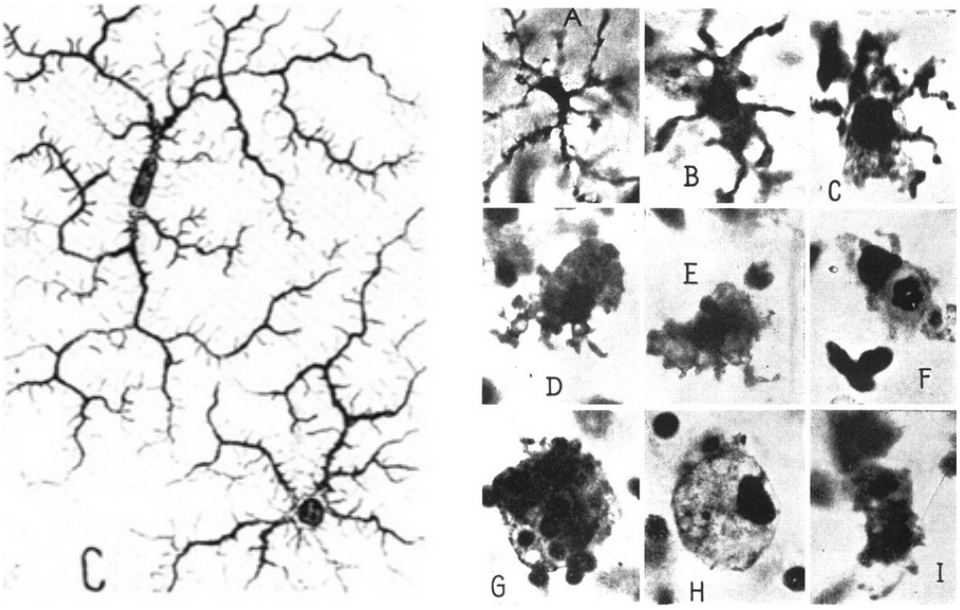
II.9 Longueur moyenne des épines de néo-neurones de souris sauvages et C3$^{-/-}$ 104
II.10 Longueur moyenne des épines de néo-neurones de 3 et 6 semaines . . . 105
II.11 Longueur moyenne des épines de souris sauvages et C3$^{-/-}$ 106

IV.1 Bilan 120

Introduction

I.A Microglie

I.A.1 Petit historique



(a) Microglie dessinée par del Río Hortega

(b) Photomicrographes de microglie réalisés par del Río Hortega

FIGURE I.1 – La microglie par del Río Hortega
(a) : Dessins tirés de [del Rio-Hortega, 1919] (b) évolution de la microglie durant son activité phagocytaire. A, cellule à prolongements épais et rugueux ; B, cellule à prolongements courts et corps cellulaire élargi ; C ; cellule hypertrophique à pseudopodes ; D, E, formes amiboïde à pseudopodes ; F, cellule ayant phagocyté un leucocyte ; G, cellule ayant phagocyté de nombreux érythrocytes ; H, cellule à granules lipidiques ; I, cellule mitotique. Tiré de [del Rio-Hortega and Penfield, 1932].

Le père de la microglie est généralement considéré être Pío del Río-Hortega, un étudiant de Santiago Ramón y Cajal. C'est lui qui leur a donné le nom de microglie en 1919 [del Rio-Hortega, 1919], puis a caractérisé leur réponse à des lésions cérébrales

(Figure I.1) [del Rio-Hortega, 1939; del Rio-Hortega and Penfield, 1932].

Cependant, sans vouloir amoindrir les découvertes de del Río-Hortega, il faut replacer ses travaux dans leur contexte. La microglie avait déjà été observée auparavant à plusieurs reprises, notamment par Victor Babeş, qui avait remarqué dans le tissu cérébral des amas de cellules ramifiées dans des cas de rage et d'autres infections cérébrales dès 1892 [Babes, 1892]. Ramón y Cajal a aussi consacré une partie de sa carrière à la recherche de méthodes de marquage spécifiques des différents types cellulaires présents dans le cerveau, en particulier la glie [García-Marín et al., 2007]. Nous devons à Ramón y Cajal la première publication scientifique entièrement dévolue à la neuroglie [Garcia-Segura, 2002; Ramon y Cajal, 1897]. Les méthodes de coloration utilisées par Ramón y Cajal pour marquer la neuroglie ne permettaient pas de différencier la microglie des oligodendrocytes : il les appelait de manière collective « le troisième élément » [Tremblay et al., 2015]. Del Río-Hortega a développé de nouvelles techniques de coloration [del Rio-Hortega, 1916] qui lui ont permis quelques années plus tard d'identifier et définir la microglie [del Rio-Hortega, 1919] (Figure I.1a).

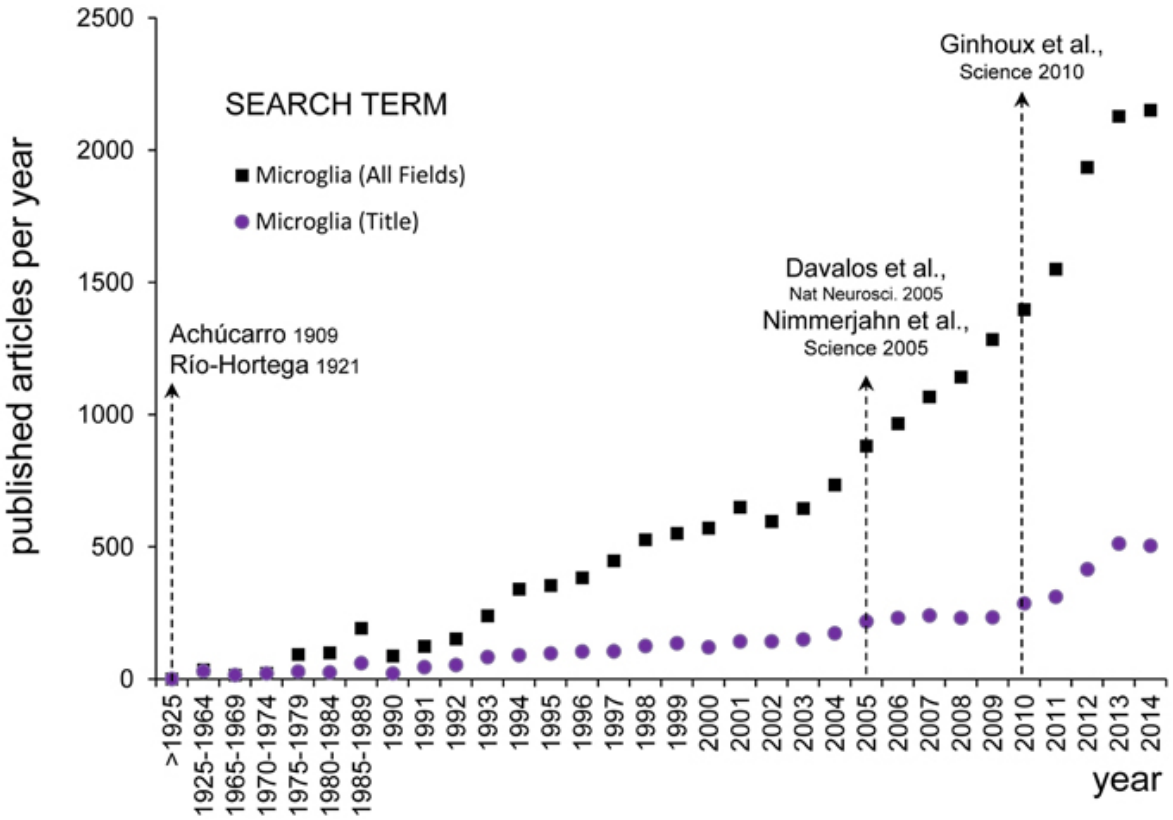


FIGURE I.2 – Évolution de la recherche sur la microglie.
Nombre de publications contenant le mot « microglie » dans le titre ou dans tous les champs (www.ncbi.nlm.nih.gov). Le nombre annuel de publications sur le sujet était très restreint du début du XXe siècle jusqu'en 1990 (456 publications en tout), alors qu'il se compte en milliers depuis le début des années 2000 (1180 par an en moyenne sur la période 2000-2014). Le nouvel d'intérêt pour la microglie semble correspondre aux travaux fondateurs de Davalos et al. [2005] et Nimmerjahn et al. [2005], et s'accroître encore après la démonstration de l'origine vitelline de la microglie par Ginhoux et al. [2010]. Figure tirée de Tremblay et al. [2015].

Depuis lors, l'intérêt de la communauté scientifique pour la microglie n'a cessé de s'intensifier, notamment depuis le début des années 2000 (Figure I.2)

I.A.2 Origine de la microglie

I.A.2.a Origine embryonnaire

On a longtemps pensé que la microglie était issue de la lignée des cellules souches hématopoïétiques comme les monocytes et les macrophages. Déjà, del Río Hortega avait fait l'hypothèse de l'origine mésodermique des cellules microgliales (ce qui les distingue des autres cellules du système nerveux dont l'origine est neuro-ectodermique), par homologie morphologique et phénotypique avec les macrophages [del Rio-Hortega and Penfield, 1932].

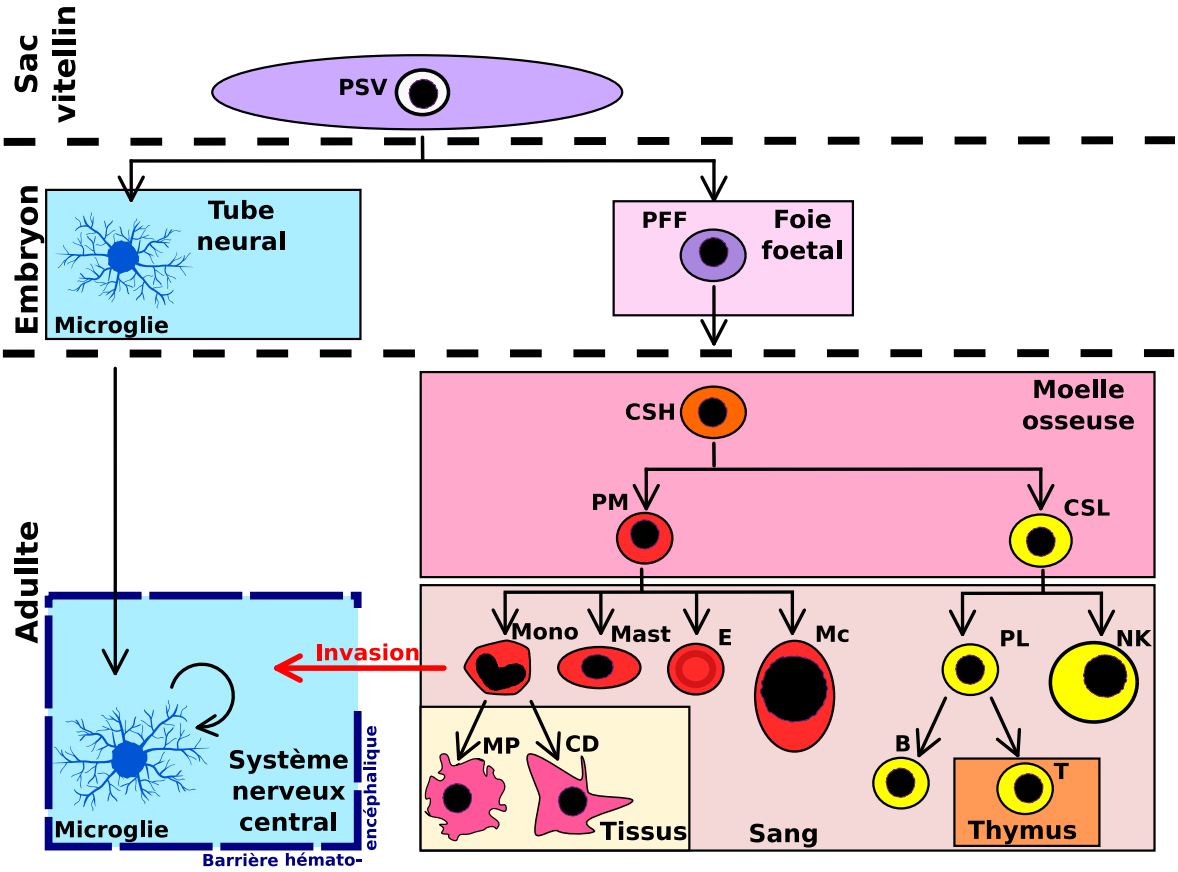


FIGURE I.3 – Origine et lignage des cellules immunitaires.
La microglie est issue des précurseurs du sac vitellin (PSV) qui envahissent le système nerveux en développement, puis s'y auto-entretiennent jusqu'à l'âge adulte (flèche circulaire). Les autres cellules immunitaires de l'organisme adulte, notamment les monocytes (Mono) sanguins et les macrophages (MP) tissulaires, sont issues des cellules souches hématopoïétiques (CSH) situées dans la moelle osseuse. Le système nerveux central est protégé par la barrière hémato-encéphalique, mais en cas de rupture de celle-ci, des cellules immunitaires périphériques (notamment les monocytes) peuvent envahir et coloniser le système nerveux central (flèche rouge). PFF : précurseur du foie fœtal ; PM : précurseur myéloïde ; Mast : mastocyte ; E : érythrocyte ; Mc : mégacaryocyte ; CD : cellule dendritique ; CSL : cellule souche lymphoïde ; PL : précurseur lymphocytique ; B : lymphocyte B ; C : lymphocyte C ; NK : *natural killer*.

Cependant, les cellules microgliales peuvent être observées très tôt durant le développement, dès le 9e jour et demi de développement embryonnaire (que l'on note E9,5) chez la souris. Or, les cellules myeloïdes (dont font partie les monocytes) n'apparaissent qu'à E12,5, à partir des cellules souches hématopoïétiques du foie fœtal (Figure I.3). Les premières cellules microgliales ne peuvent donc pas être dérivées de ces cellules souches hématopoïétiques [Ginhoux and Prinz, 2015]. Des résultats similaires avaient déjà été trouvés chez le poisson zèbre [Herbomel et al., 2001], ce qui montre une forte conservation de la microglie dans l'évolution.

Les premières cellules microgliales sont en fait dérivées de précurseurs situés dans le sac vitellin [Ginhoux et al., 2010]. Lors d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques suite à une irradiation sub-léthale, alors que la majorité des leucocytes circulants proviennent du donneur, 95 % de la microglie est toujours issue du receveur. Ainsi chez la souris, la microglie semble s'auto-renouveler indépendamment des cellules souches hématopoïétiques, à partir de précurseurs locaux résistants aux radiations qui colonisent le cerveau avant la naissance. De plus, Ginhoux et al. ont réalisé des expériences de lignage cellulaire : en marquant spécifiquement les cellules du sac vitellin de manière inductible, ils ont prouvé qu'avant E7,5 les progéniteurs de cellules myeloïdes donnent spécifiquement naissance à la microglie, et non aux leucocytes circulant. D'autres études [Kierdorf et al., 2013; Schulz et al., 2012] ont depuis confirmé que la microglie est originaire du sac vitellin en utilisant d'autres lignées de souris (Figure I.3).

L'origine principalement vitelline de la microglie semble unique. Les autres populations de macrophages résidents étudiées jusqu'à présent, comme les cellules de Langerhans [Hoeffel et al., 2012] ou les macrophages alvéolaires [Guilliams et al., 2013], dérivent principalement du foie fœtal (Figure I.3).

Cependant, une étude récente sur le poisson zèbre avec une meilleure résolution spatio-temporelle semble montrer que l'origine de la microglie adulte est différente de la microglie embryonnaire. Cette dernière provient bien de la région équivalente au sac vitellin chez la souris, mais les cellules microgliales adultes proviendraient de la paroi ventrale de l'aorte dorsale, un tissu également impliqué dans l'hématopoïèse embryonnaire et néonatale chez la souris [Xu et al., 2015].

I.A.2.b Origine à l'âge adulte

I.A.2.b.i En conditions homéostatiques

La microglie s'auto-renouvelle principalement à partir des cellules issues du sac vitellin sans apport des cellules souches hématopoïétiques, comme l'ont montré des travaux de lignage cellulaire [Ginhoux and Prinz, 2015]. De plus, des études utilisant le marqueur CX3CR1, (récepteur à la fractalkine) [Goldmann et al., 2013; Yona et al., 2013] ont permis de montrer que les cellules microgliales (ainsi que d'autres macrophages

résidents comme ceux du foie et de la rate) ont une durée de vie de plusieurs mois, contrairement aux monocytes circulants qui sont rapidement renouvelés. De plus, des expériences de parabiose au long cours chez la souris ont confirmé la stabilité de la microglie : alors que les monocytes circulants proviennent des deux animaux reliés par leur péritoine, le cerveau de chaque souris ne contient pas de cellules microgliales de l'autre souris [Ajami et al., 2007; Ginhoux et al., 2010].

I.A.2.b.ii Origine en conditions pathologiques

En conditions physiologiques les monocytes circulants ne participent pas au renouvellement de la microglie. Mais qu'en est-il en cas de pathologie ? Lors de certaines infections, notamment lorsque la barrière hémato-encéphalique est rompue, des cellules périphériques ne pourraient-elles pas s'infiltrer dans le cerveau ?

Dans une première expérience, Hickey and Kimura [1988] ont montré grâce à une greffe de moelle osseuse après irradiation chez le rat que les macrophages périvasculaires sont renouvelés par les cellules du greffon. La microglie, en revanche, n'est pas remplacée. La même expérience a pu être conduite dans l'espèce humaine – lorsque des femmes ont reçu une greffe de moelle osseuse provenant d'un homme – et ont conduit aux mêmes résultats [Unger et al., 1993]. Plus tard, des études utilisant des greffes de cellules souches hématopoïétiques marquéees par la protéine fluorescente verte GFP ont trouvé des cellules de microglie exprimant la GFP dans le parenchyme cérébral plusieurs semaines après la transplantation [Eglitis and Mezey, 1997; Priller et al., 2001]. Suite à cette étude, beaucoup de travaux ont abondé en ce sens, jusqu'à ce que Ajami et al. [2007] et Mildner et al. [2007] ne montrent simultanément que la microglie n'est remplacée par des cellules périphériques que lorsque les souris sont irradiées avant la greffe. En effet, chez des souris irradiées mais dont la tête est protégée des radiations, la microglie n'est pas remplacée par des cellules périphériques, contrairement aux souris entièrement irradiées. Le mécanisme par lequel l'irradiation prédispose la microglie à être remplacées par des cellules périphériques passe probablement par la rupture de la barrière hémato-encéphalique (Figure I.3). Lors des expériences de parabiose déjà évoquées au paragraphe I.A.2.b.i, les cellules circulantes sont partagées par les animaux, mais ne donnent pas de microglie, même en cas de maladie neurodégénérative [Ajami et al., 2007]. Par ailleurs, ce groupe a montré plus tard en combinant parabiose et irradation que l'invasion du système nerveux central par des monocytes périphériques est transitoire. Les monocytes circulants ne semblent donc pas contribuer à la réserve de microglie résidente.

Cependant, même si les cellules immunitaires périphériques qui pénètrent le cerveau peuvent être distinguées de la microglie, il ne faut pas minimiser l'impact que peut avoir cette infiltration. Ces monocytes recrutés ont probablement un rôle clef dans la sclérose

en plaques, comme montré dans le modèle associé chez la souris, l'encéphalomyélite autoimmune [King et al., 2009; Mildner et al., 2009].

I.A.3 Marqueurs moléculaires de la microglie

I.A.3.a Microglie et macrophages

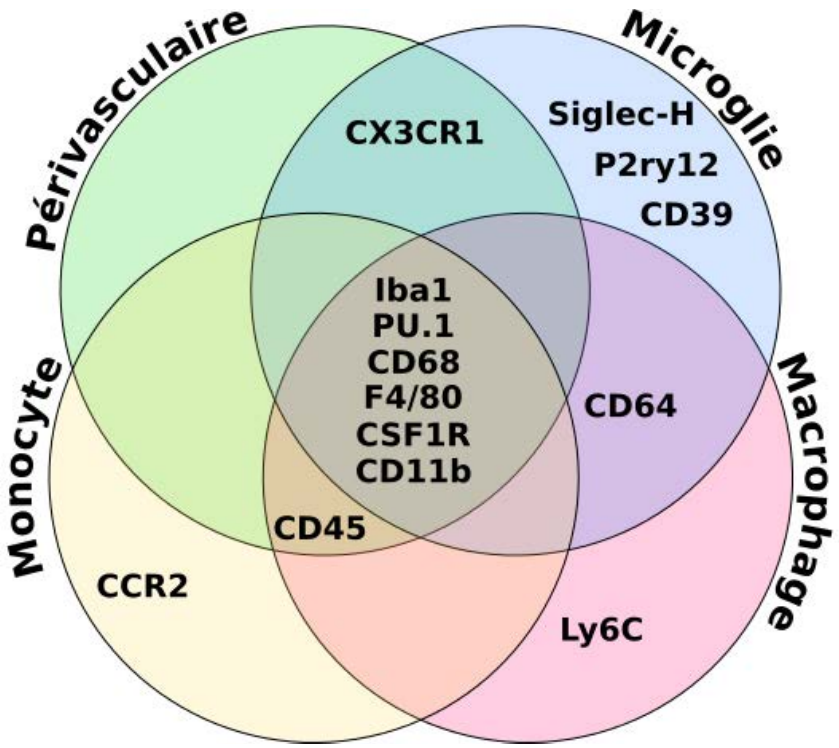


FIGURE I.4 – Marqueurs moléculaires spécifiques de la microglie et partagés avec les macrophages périvasculaires, monocytes et macrophages.

Alors que la microglie se distingue des autres cellules immunitaires de par son origine (voir I.A.2.a), elle partage pourtant un certain nombre de marqueurs moléculaires avec les monocytes et macrophages tels que le CD11b (*Cluster of Differenciation 11b*) et F4/80 [Perry et al., 1985], mais aussi CSF-1 (*Colony Stimulatng Factor 1 Receptor*) et Iba-1 (*Ionized calcium-binding adapter molecule 1*) [Prinz and Mildner, 2011]. Il est communément admis que dans les conditions physiologiques, les seules cellules à exprimer ces marqueurs dans le système nerveux central sont les cellules microgliales. Cependant, en cas d'invasion du système nerveux central par des monocytes périphériques (voir I.A.5.a.iii), aucun de ces marqueurs moléculaires ne permet de discriminer entre les deux types cellulaires (Figure I.4).

Selon des données récentes, CD39 (*Cluster of Differenciation 39*) est exprimé spécifiquement dans la microglie (et non dans les monocytes), alors que Ly6C est exprimé uniquement dans les monocytes [Butovsky et al., 2012]. Par ailleurs, des études de transcriptomique ont trouvé une signature unique de la microglie par rapport aux

autres macrophages [Chiu et al., 2013; Gautier et al., 2012]. CX3CR1 est exprimé dans la microglie beaucoup plus fortement que dans les macrophages périphériques (Figure I.4). Les protéines surexprimées dans la microglie semblent en grande partie appartenir au « sensome », qui lui permet de sonder son environnement (voir paragraphe I.A.5.a.i), par exemple P2ry12, Sighlec-H ou CX3CR1 [Hickman et al., 2013].

Enfin, même en conditions physiologiques la microglie n'exprime pas les mêmes marqueurs et n'a probablement pas les mêmes fonctions à travers tout le cerveau, comme le montre une étude récente de transcriptomique [Grabert et al., 2016].

I.A.3.b Polarisation de la microglie

On distingue schématiquement deux profils d'activation de la microglie : le profil M1 pro-inflammatoire, et le profil M2 anti-inflammatoire (Figure I.5).

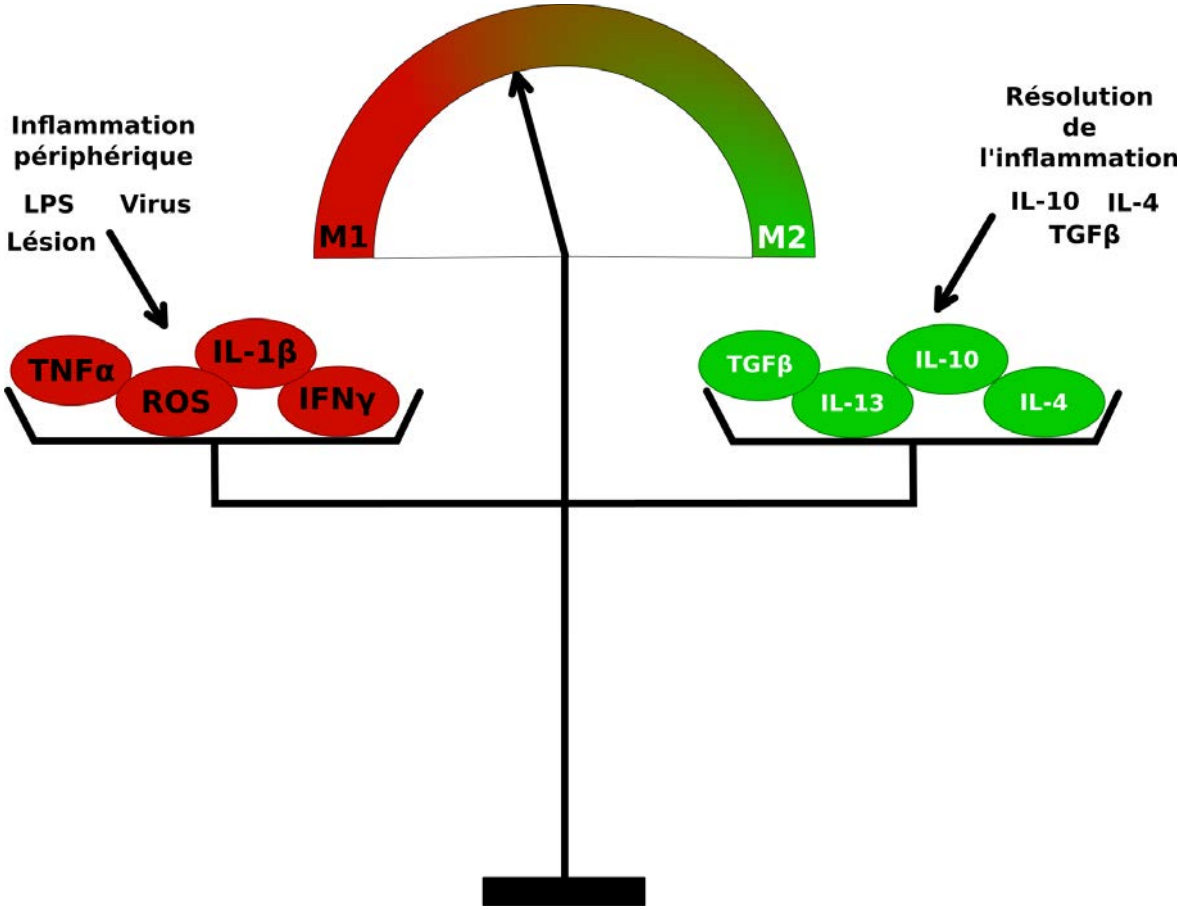


FIGURE I.5 – Polarisation de la microglie.
L'état d'activation de la microglie est une balance qui répond à son environnement : lésions, cytokines pro ou anti-inflammatoires, dérivé réactif de l'oxygène (ROS)...

I.A.3.b.i Polarisation M1

La microglie peut reconnaître des stimuli nocifs grâce à une batterie de récepteurs immunitaires comme les *Toll-Like Receptor* (TLR), *Nucleotide-binding Oligomerization Domain* (NOD) et les récepteurs éboueurs ou *scavengers* [Ransohoff and Brown, 2012; Ransohoff and Cardona, 2010]. Lorsque l'un de ces récepteurs est activé, ou bien en présence de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α (*Tumor Necrosis Factor-α*) ou l'interféron-γ, la microglie et les macrophages infiltrants éventuels se polarisent vers un phénotype pro-inflammatoire M1 [Villalta et al., 2009]. La microglie produit alors des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF-α, interleukine (IL)-1α IL-1β, IL-6 IL-12, IL-23, peut présenter des antigènes, et exprime fortement la *inducible NO synthase* (iNOS) [Orihuela et al., 2016]. La microglie M1 exprime aussi des chimiokines, des molécules oxydo-réductrices (NADPH oxydase, iNOS...), des récepteurs éboueurs et le Compexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH)-II [Boche et al., 2013; Colton and Wilcock, 2010; Hanisch and Kettenmann, 2007; Henkel et al., 2009; Ransohoff and Perry, 2009]. L'action combinée de ces différents facteurs permet de détruire le pathogène incriminé et de polariser les cellules T pour qu'elles montent une réponse immunitaire adaptative [Orihuela et al., 2016].

Expérimentalement, la polarisation M1 est souvent obtenue grâce à des dérivés bactériens (comme le lipoposysaccharide, ou LPS), viraux (ADN/ARN viral) ou les signaux associés (comme l'interféron-γ) [Martinez and Gordon, 2014]. Une polarisation similaire peut être obtenue en l'absence de micro-organisme en cas de traumatisme crânien, d'ischémie ou d'exposition à des agents chimiques [Chen and Nuñez, 2010; McPherson et al., 2014; Shechter and Schwartz, 2013]. L'exposition chronique à des glucocorticoïdes exogènes tend également à induire un phénotype M1 dans l'hippocampe [Frank et al., 2014].

L'acquisition du phénotype M1 suite à l'activation de la microglie passe par des facteurs de transcription, tels que le *Nuclear Factor κB* (NF-κB) et STAT1 [Orihuela et al., 2016; Shih et al., 2015]. Dans les études présentées dans cette thèse, nous avons utilisé le CD68 (*Cluster of Differenciation 68*) comme marqueur de l'activation M1 de la microglie.

I.A.3.b.ii Polarisation M2

Le concept d'activation « alternative » des macrophages est apparu au début des années 1990, grâce à l'observation que l'IL-4 provoque à la fois la surexpression du CMH-II et de CD206 et l'inhibition des cytokines pro-inflammatoires [Stein et al., 1992]. Des études ultérieures ont montré l'expression de cytokines anti-inflammatoires telles que IL-4, IL-10, IL-13 et *Transforming Growth Factor β* (TGFβ) par la microglie M2 [Colton, 2009; Henkel et al., 2009]. Les macrophages M2 jouent un rôle dans la réponse allergique, la résolution de l'inflammation, le remodelage tissulaire, l'immunorégulation

et la promotion tumorale [Sica and Mantovani, 2012]. Il existe des différences entre microglie et macrophages périphériques, par exemple la microglie semble ne pas exprimer le marqueur CD206 [Durafourt et al., 2012]. L'activation M2 n'est pas unique, mais dépend de son élément déclencheur. On peut notamment différencier l'état M2 produit par IL-4 qui induit le facteur de transcription STAT6 et celui produit par IL-10 qui induit STAT3, ce qui va conduire à des profils d'expression de cytokines et chimiokines différents [Orihuela et al., 2016].

La distinction entre polarisation M1 pro-inflammatoire et M2 anti-inflammatoire est utile, mais il faut garder en tête qu'il s'agit d'une polarisation, avec tout un spectre entre les deux, et non deux états parfaitement distincts [Cherry et al., 2014].

I.A.4 Hétérogénéité de la microglie

I.A.4.a Répartition de la microglie

Globalement, la microglie représente chez la souris 10 à 15 % des cellules du système nerveux central, ce qui est similaire à la proportion des macrophages dans les tissus périphériques [Carson et al., 2006; Lawson et al., 1990]. La microglie n'est pas répartie de manière homogène dans le système nerveux central. Chez la souris, le télencéphale olfactif est la région la plus densément peuplée de cellules microgliales, suivie par l'hippothalamus et les ganglions de la base ; la substance blanche, le cervelet et le tronc cérébral arborent au contraire particulièrement peu de cellules microgliales [Lawson et al., 1990]. De manière surprenante, Mittelbronn et al. [2001] ont trouvé la tendance opposée dans le cerveau humain sain : la microglie y est moins dense dans la substance grise.

I.A.4.b Morphologie de la microglie

Il existe des variations régionales de la morphologie des cellules microgliales en fonction du micro-environnement alentour. Dans la substance blanche, la microglie a une morphologie plutôt bipolaire parallèle ou perpendiculaire aux fibres, alors que dans la substance grise elle présente de nombreux prolongements en étoile [Lawson et al., 1990]. À proximité des zones où la barrière hémato-encéphalique est réduite, la microglie arbore une forme plus amiboïde, notamment à proximité des ventricules et du plexus choroïde [Lawson et al., 1990].

Au sein du parenchyme cérébral, la microglie peut prendre des formes extrêmement diverses, pouvant aller d'un sphéroïde à une étoile complexe, en passant par de nombreux intermédiaires amiboïdes [Bohatschek et al., 2001; Dailey and Waite, 1999;

Nimmerjahn et al., 2005; Tremblay, 2011]. Les cellules microgliales peuvent passer continument d'un état à l'autre, comme montré Figure I.6.

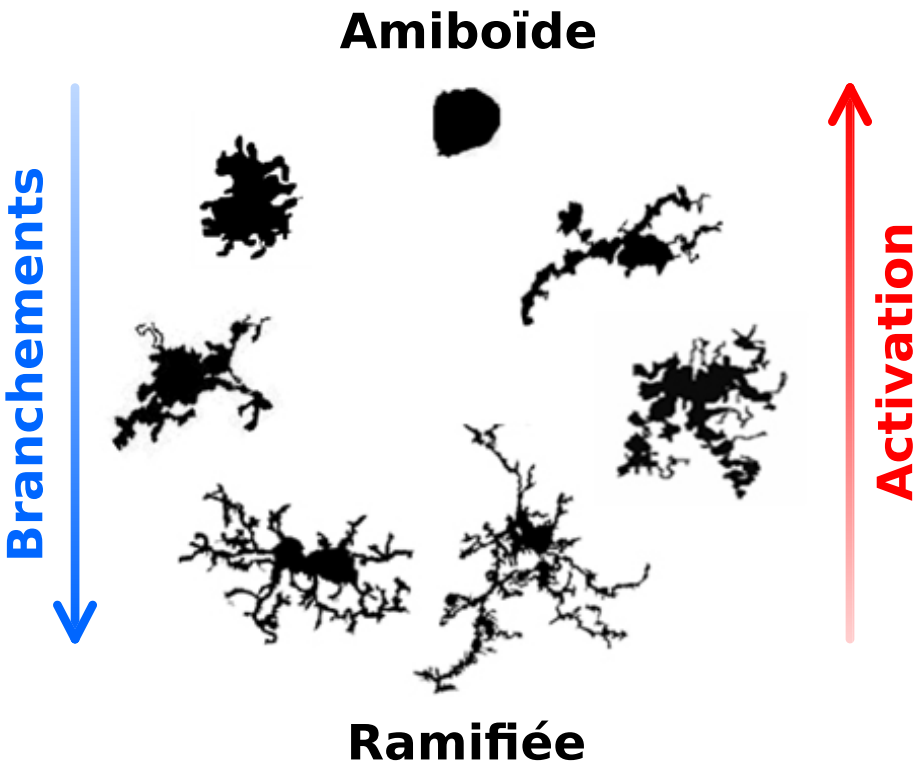


FIGURE I.6 – Morphologies de la microglie dans le système nerveux central humain.
Adapté de [Karperien et al., 2013].

Il existe un lien entre morphologie et états d'activation de la microglie (décrits au paragraphe I.A.3.b). Les cellules microgliales à large soma, dont les processus sont peu nombreux et épais (en haut sur la Figure I.6) sont considérées comme « activées », « réactives » ou « intermédiaires ». Elles produisent des cytokines, peuvent se déplacer jusqu'au site d'une blessure, proliférer, recruter, activer ou phagocyter d'autres cellules [Sołtys et al., 2001; Stence et al., 2001; Streit, 2000].

Dans le système nerveux central mature en conditions normales, la microglie est très ramifiée, avec des branches secondaires et tertiaires branchées sur des branches primaires tortueuses (en bas sur la Figure I.6). Elle joue alors des rôles physiologiques importants (voir paragraphe I.A.5.a.i), et ses nombreuses branches lui permettent d'explorer et interagir avec son environnement et les cellules alentour [Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005].

I.A.5 Fonctions de la microglie

I.A.5.a Fonctions macrophagiques

En tant que cellule immmunitaire résidente du système nerveux central, la microglie a naturellement un rôle important dans la neuroinflammation et la réponse aux attaques

d'origine infectieuse ou non [Gomez-Nicola and Perry, 2014].

I.A.5.a.i En conditions physiologiques

L'une des fonctions des macrophages est d'éliminer par phagocytose les cellules mortes et les débris associés. De même, la microglie phagocyte les cellules apoptotiques, notamment lors du développement où l'apoptose est un phénomène courant et physiologique [Bessis et al., 2007; Ferrer et al., 1990; Oppenheim, 1991; Vaux and Korsmeyer, 1999] (voir paragraphe I.A.5.b.i). La phagocytose des cellules apoptotiques permet d'éviter le relargage de molécules toxiques et pro-inflammatoires, donc cette phagocytose est bénéfique pour l'homéostasie cérébrale [Chan et al., 2006].

Il a été montré grâce à des expériences d'imagerie chez la souris [Nimmerjahn et al., 2005] et le poisson zèbre [Li et al., 2012, 2013] qu'au repos, la microglie a des prolongements extrêmement motiles, alors que son soma est immobile. Les prolongements contactent préférentiellement les neurones actifs, ce qui a pour effet de diminuer l'activité de ces neurones [Li et al., 2012]. La microglie effectue donc un rétrocontrôle négatif sur l'activité neuronale. Les cellules microgliales forment une mosaïque : chacune occupe un certain volume de parenchyme sans entrer en contact avec ses voisines [Nimmerjahn et al., 2005]. Cependant, dès qu'une lésion vient endommager la barrière hémato-encéphalique, la microglie devient active et migre vers le lieu de la lésion [Nimmerjahn et al., 2005]. Lors du vieillissement, la motilité des prolongements diminue, alors que celle du corps cellulaire augmente [Hefendehl et al., 2014].

De nombreuses cytokines et molécules immunitaires ont été récemment impliquées dans des processus neuronaux tels que la plasticité synaptique et la neuromodulation [McAfoose and Baune, 2009]. Un réseau complexe de cytokines incluant IL-1β, IL-6 et TNF-α a été impliqué dans la potentiation à long terme (LTP) [del Rey et al., 2013]. IL-1β et IL-6 sont tous deux exprimés après l'induction de la LTP, mais ils ont des effets opposés : IL-1β soutient l'apprentissage, alors qu'IL-6 l'empêche [Goshen and Yirmiya, 2009; Schneider et al., 1998].

La microglie veille donc en permanence à la physiologie du système nerveux central [Hanisch and Kettenmann, 2007; Sierra et al., 2014], et participe au bon fonctionnement des neurones [Gomez-Nicola and Perry, 2014].

I.A.5.a.ii Fonctions de la microglie en cas d'infection

La barrière hémato-encéphalique empêche la plupart des agents pathogènes d'entrer dans le système nerveux central. Cependant, un certain nombre de pathogènes peuvent l'atteindre malgré tout. Nous prendrons ici deux exemples pour illustrer l'entrée d'agents pathogènes dans le cerveau.

— **Le virus de la rage** est un virus neurotropique qui infecte généralement d'abord les cellules musculaires, d'où il peut passer aux cellules nerveuses à travers la jonction neuro-musculaire [Gluska et al., 2014] puis atteindre le système nerveux central par transport rétrograde [1] [Tsiang et al., 1983].

— **La méningite** est une inflammation des méninges pouvant être causée entre autres par une bactérie capable de pénétrer dans le cerveau à travers la barrière hémato-encéphalique intacte [Barichello et al., 2016].

Pour examiner l'action de la microglie sur un pathogène, considérons le cas de la méningite bactérienne. Lorsque les bactéries se répliquent, elles produisent des motifs moléculaires associés aux pathogènes (*Pathogene Associated Molecular Patterns* ou PAMP) reconnus par la microglie. Cette dernière produit alors des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires qui permettent le recrutement de leucocytes périphériques et l'élimination de la bactérie. La microglie est donc importante pour le contrôle de l'infection, mais son activation M1 prolongée peut agraver la maladie et entrainer des effets secondaires [Barichello et al., 2016].

I.A.5.a.iii Fonctions de la microglie en cas d'inflammation

Au sens strict, par homologie avec l'inflammation, la neuroinflammation ne concerne que les situations où des leucocytes périphériques sont recrutés dans le parenchyme cérébral. C'est le cas lors de traumatismes crâniens, d'ischémie cérébrale ou d'infections du système nerveux central. En l'absence d'entrée de leucocytes, il est plus exact de parler d'activation microgliale que de neuroinflammation [DiSabato et al., 2016; Estes and McAllister, 2014]. Nous traiterons ici principalement des effets de l'inflammation périphérique sur la microglie et le système nerveux central.

Les cytokines sécrétées lors d'une inflammation périphérique peuvent activer des réseaux nerveux afférents (comme le nerf vague), et des cytokines pro-inflammatoires peuvent entrer dans le système nerveux central [Dantzer et al., 2008]. La microglie devient alors active et se met à produire des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1α, l'IL-6 et le TNF-α [Chen et al., 2012; Henry et al., 2009] qui pourront agir sur le système nerveux central. Ces effets sont tout d'abord bénéfiques, notamment à travers le *sickness behavior* [Dantzer et al., 2008] qui permet d'alouer le maximum de ressources énergétiques à la lutte contre le pathogène [Berg et al., 2004; Bluthé et al., 2000], et de limiter la propagation inter-individus de la maladie (dans le cas où celle-ci est transmissible) par diminution des interactions sociales [DiSabato et al., 2016]. Lorsque le *sickness behavior* est empêché, la morbidité et la mortalité sont augmentées

1. La capacité du virus de la rage à passer les synapses de manière rétrograde (dans le sens inverse de la transmission synaptique) en fait un bon outil pour l'étude des réseaux neuronaux [Zampieri et al., 2014].

[Corona et al., 2013], montrant l'importance de ce phénomène physiologique. L'expression de cytokines pro-inflammatoires est normalement transitoire et rapidement résolue [Norden et al., 2016], et se produit sans rupture de la barrière hémato-encéphalique ni entrée de cellules périphériques, et sans conséquences neuropathologiques [Dantzer et al., 2008].

L'inflammation (ou l'activation pro-inflammatoire de la microglie) dans le système nerveux central est bénéfique lorsqu'elle est contrôlée et limitée dans le temps, mais peut se révéler délétère dans certaines conditions. Le stress chronique (induit par exemple par des chocs électriques, des événements stressants imprévisibles ou des défaites sociales répétées, ou bien par l'apport exogène de glucocorticoïdes) induit la polarisation M1 de la microglie [Frank et al., 2007, 2014]. Par la suite, des cellules immunitaires périphériques envahissent le cerveau, particulièrement dans les zones liées à l'anxiété [Tynan et al., 2010; Wohleb et al., 2013] ; empêcher l'invasion par ces cellules périphériques suffit à bloquer l'induction de comportements liés au stress chez la souris [Wohleb et al., 2014]. Ainsi, les comportements liés au stress semblent dus à une dérégulation de la balance inflammation / anti-inflammation et à l'entrée de cellules immunitaires périphériques dans le cerveau.

L'inflammation périphérique semble également impliquée dans l'induction et la gravité de maladies neurodégénératives (voir aussi paragraphe I.C.6.e) [Cunningham, 2013]. Nous l'illustrerons principalement sur l'exemple de la maladie de Parkinson. Selon des études épidémiologiques, l'usage à long terme d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (en particulier l'ibuprofène) semble protecteur contre le développement ultérieur de maladies neurodégénératives telles que Parkinson [Chen et al., 2005] ou Alzheimer [Vlad et al., 2008]. Ainsi l'inflammation pourrait avoir un rôle dans l'initiation des maladies neurodégénératives. Par ailleurs, la Parkin, protéine mutée dans des formes familiales de maladie de Parkinson, semble être moins exprimée en contexte inflammé chez la souris [Tran et al., 2011], ce qui suggère que l'inflammation pourrait provoquer un phénotype similaire à la mutation de la Parkin, et ainsi induire la maladie. L'injection dans la substance noire de rongeurs d'α-synucléine (protéine formant des aggrégats extracellulaires cytotoxiques dans la maladie de Parkinson) active la microglie et provoque l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires, surtout lorsqu'elle est couplée à une inflammation périphérique [Couch et al., 2011]. Un autre modèle d'induction de Parkinson, l'injection de 6-Hydroxy-DopAmine (6-OHDA) dans la substance noire peut aussi provoquer l'activation microgliale, probablement suite à la mort neuronale [Depino et al., 2003]. L'administration chronique de LPS peut augmenter la neurodégénerescence dans des modèles de maladies neurodégénératives chez la souris [Frank-Cannon et al., 2008; Lee et al., 2008], et une seule injection systémique de LPS suffit à augmenter la mort des neurones dopaminergiques dans des modèles de maladie de Parkinson [Gao et al., 2011; L'Episcopo et al., 2011]. De même, l'expression chro-

nique et systémique de IL-1β augmente la dégénérescence neuronale dans des souris traitées au 6-OHDA [Pott Godoy et al., 2008].

La microglie a un rôle phagocytaire important lorsque beaucoup de cellules meurent, par exemple dans les maladies neurodégénératives [Cunningham, 2013; Loane and Kumar, 2016; Lopategui Cabezas et al., 2014; Yoneyama and Ogita, 2013] ou les traumatismes crâniens [Loane and Kumar, 2016]. L'impact de la phagocytose dans ces pathologies est cependant ambigu, à la fois bénéfique et délétère [DiSabato et al., 2016].

I.A.5.b Fonctions développementales de la microglie

I.A.5.b.i Pendant le développement

Comme nous l'avons vu paragraphe I.A.2.a, la microglie est présente très tôt dans le développement : dès E9,5 chez la souris [Ginhoux et al., 2010, 2013; Prinz and Priller, 2014], c'est-à-dire avant la différenciation des cellules du système nerveux [Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009]. Ainsi, elle se trouve au bon endroit au bon moment pour participer au développement cérébral.

Le développement du système nerveux central implique plusieurs étapes clefs (prolifération, migration, intégration... voir aussi paragraphe I.C.2). Nous détaillerons ici l'implication de la microglie dans chacune de ces étapes [Frost and Schafer, 2016].

— **Prolifération, survie et maturation des cellules souches neurales** : la microglie produit des facteurs impliqués dans la survie, la prolifération et la maturation des cellules souches neurales dans le cerveau en développement. Par exemple, l'addition de milieu de culture conditionné par de la microglie à des cultures neuronales augmente la prolifération des cellules souches neurales ainsi que la maturation et la survie des neurones [Chamak et al., 1994; Morgan et al., 2004; Nagata et al., 1993]. De même, la prolifération de cellules souches neurales isolées de cortex de souris dont la microglie est déficiente (PU.1$^-$) est diminuée, et cet effet est annulé par l'ajout de microglie de souris normales (PU.1$^+$ [Antony et al., 2011]. Ueno et al. [2013] ont montré que chez les souris déficientes en CX3CR1 (CX3CR1$^{-/-}$) (de même que lorsque la microglie est enlevée chimiquement ou génétiquement), le nombre de neurones apoptotiques est supérieur aux contrôles dans la couche 5 du cortex. Cet effet ne semble pas être dû à une élimination inefficace des cellules apoptotiques, car la phagocytose par la microglie est similaire entre souris CX3CR1$^{-/-}$ et sauvages. [Ueno et al., 2013]. Le mécanisme par lequel la microglie favorise la survie des neurones semble passer par l'*Insulin-like Growth Factor* (IGF)-1, un puissant facteur trophique pour la survie des cellules souches neurales, qui est moins produit dans les souris CX3CR1$^{-/-}$ [Mizutani et al., 2012; Nishiyori et al., 1998; Wolf et al., 2013]. Selon une autre étude

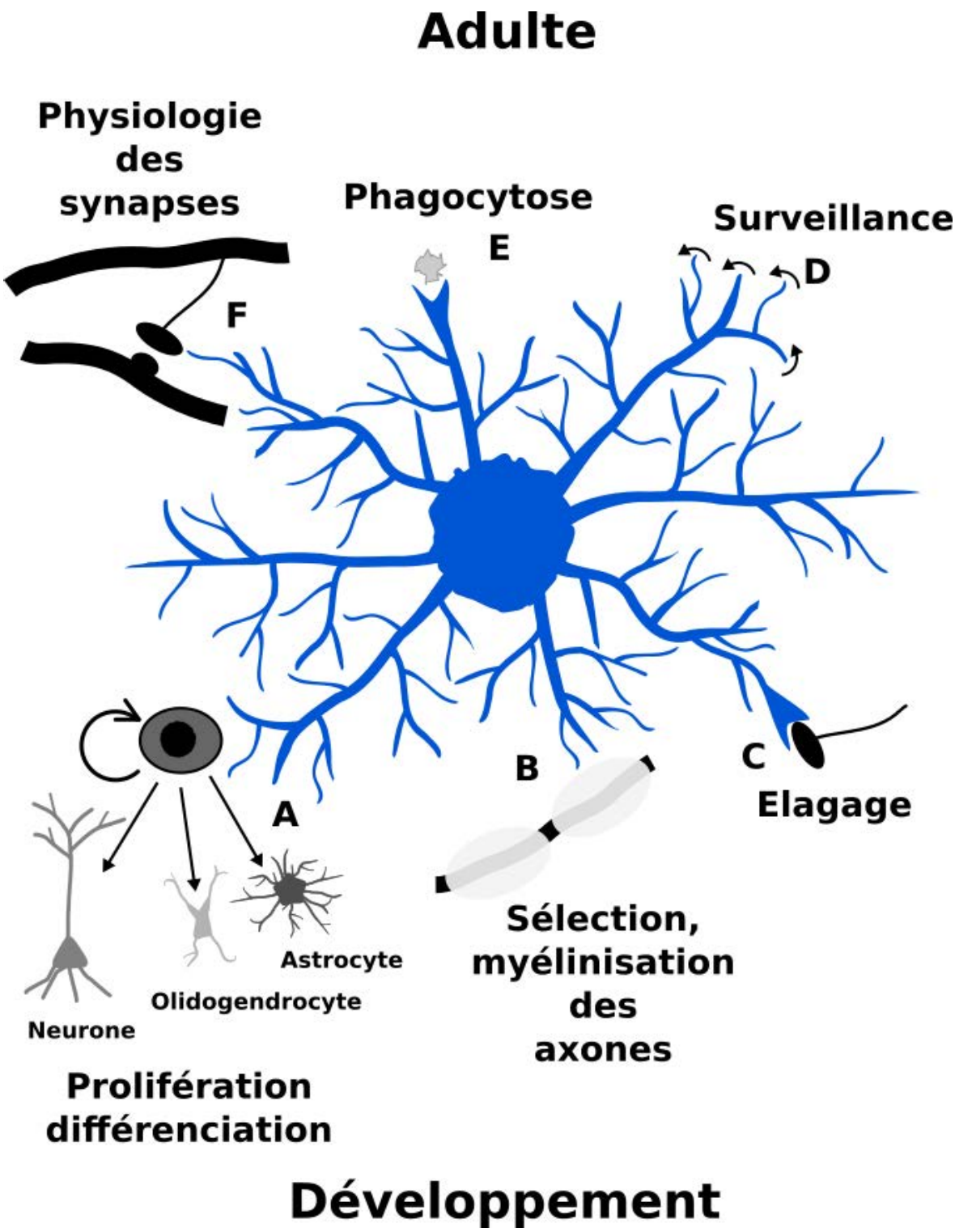


FIGURE I.7 – Fonctions physiologiques de la microglie.
En bas, dans le cerveau en développement, la microglie participe à la prolifération et la différenciation des cellules souches en neurones et en cellules gliales (A) ; à la sélection des axones, leur myélinisation et leur fasciculation (B) ; à l'élagage des épines surniméraires (C, voir aussi paragraphes I.A.6.c pour plus de détails). En haut, dans le cerveau adulte (voir paragraphe I.A.5.a.i), la microglie surveille l'homéostasie du parenchyme cérébral grâce à la motilité de ses prolongements (D) ; phagocyte les débris (E) ; participe à la physiologie des synapses (notamment aux processus de potentiation à long terme impliqués dans la mémoire) et réduit l'excitation des neurones en contactant les synapses actives (F).

[Shigemoto-Mogami et al., 2014], l'inactivation de la microglie par la minocycline diminue la prolifération des cellules souches neurales et le nombre d'oligodendrocytes dans la zone sous-ventriculaire, ce qui laisse penser que la microglie aurait un rôle positif dans la prolifération des cellules souches neurales et la dendrogenèse.

— **Apoptose** : durant le développement, des neurones sont produits en surnombre, et certains sont éliminés par apoptose [Oppenheim, 1991; Vaux and Korsmeyer, 1999]. Des techniques d'imagerie chez le rongeur ont permis de montrer que la microglie phagocyte des neurones durant le développement [Bessis et al., 2007; Ferrer et al., 1990]. Cependant, ces études ne déterminent pas si elle se contente d'engouffrer les cellules apoptotiques, ou bien si elle joue un rôle dans l'initiation de l'apoptose. Il semblerait qu'elle participe activement à l'apoptose, comme l'ont montré plusieurs études in vitro sur l'embryon de poulet [Frade and Barde, 1998], la souris [Marín-Teva et al., 2004] ou encore le rat [Sedel et al., 2004]. Chacune de ces études a identifié une molécule par laquelle la microglie induirait l'apoptose (respectivement le *Nerve Growth Factor* (Ngf), les ions superoxyde et le TNF-α), mais la relation entre ces différentes voies n'est pas claire. In vivo, chez le macaque et le rat, la microglie phagocyte les cellules souches neurales lorsque le développement prend fin, et le nombre de cellules souches neurales est augmenté quand la microglie est inhibée par un antibiotique à large spectre (minocycline ou doxycycline), ou supprimée par du clodronate liposomal [Cunningham, 2013]. Réciproquement, l'activation de la microglie par injection de LPS *in utero* diminue le nombre de cellules souches neurales. Ainsi, un faisceau d'arguments désigne la microglie comme régulatrice de la neurogenèse embryonnaire par induction de l'apoptose des cellules souches neurales. Ces manipulations n'étant pas parfaitement spécifiques de la microglie, des expériences supplémentaires (par exemple en utilisant des méthodes génétiques) sont nécessaires pour établir avec certitude la relation causale entre microglie et apoptose.

— **Développement des cellules gliales** : des expériences *in vitro* ont montré qu'un milieu de culture conditionné par la microglie favorise la différenciation de cellules souches neurales en astrocytes grâce à l'IL-6 [Nakanishi et al., 2007] et en oligodendrocytes *via* l'IL-1b et l'IL-6 [Shigemoto-Mogami et al., 2014], l'IGF [O'Kusky and Ye, 2012] , ou le NF-κB [Nicholas et al., 2001].

— **Vascularisation** : la suppression *in vitro* et *in vivo* de la microglie chez le rongeur suggère que cette dernière est nécessaire au branchement des vaisseaux sanguins dans la rétine et le rhombencéphale [Checchin et al., 2006; Fantin et al., 2010; Kubota et al., 2009; Rymo et al., 2011]. Cependant, une étude utilisant une préparation de rétine *ex-vivo* a montré le contraire (la suppression de la microglie augmente les branchements vasculaires) [Unoki et al., 2010]. La microglie semble

donc influencer la formation de la vasculature cérébrale, mais le débat est encore ouvert sur les modalités exactes de son influence.

— **Axones** : Berbel and Innocenti avaient déjà observé en 1988, par des techniques d'imagerie électronique et en lumière transmise, des débris axonaux phagocytés par la microglie et les astrocytes pendant le développement du corps calleux du chaton [Berbel and Innocenti, 1988]. Beaucoup plus récemmment, Squarzoni et al. [2014] ont montré de manière similaire que la microglie phagocyte un sous-ensemble d'axones de neurones dopaminergiques exprimant la Tyrosine Hydroxylase (TH^+). En outre, le nombre d'axones dopaminergiques est augmenté dans le subpallium embryonnaire lorsque la microglie est altérée ($CX3CR1^{-/-}$) ou absente ($PU.1^{-/-}$ ou traitement par anticorps anti-CSF-1R) [Squarzoni et al., 2014]. La microglie pourrait aussi être impliquée dans la myélinisation des axones en apportant du fer, cofacteur nécessaire à la myélinisation [Clemente et al., 2013; Zhang et al., 2006]. La conclusion de ces diverses études est que la microglie contribue à la croissance et la fasciculation des axones chez le rongeur.

— **Synapses** : durant le développement, les neurones commencent par créer des contacts synaptiques approximatifs. Ce réseau initial est ensuite raffiné : les connections les moins actives sont éliminées par la microglie [Hua and Smith, 2004; Katz and Shatz, 1996]. Celle-ci exprime des récepteurs aux neurotransmetteurs [Pocock and Kettenmann, 2007] et des études en imagerie dynamique ont montré qu'elle les utilise pour détecter l'activité neuronale [Schafer and Stevens, 2015; Tremblay, 2011]. L'ATP libéré par les neurones actifs régule la croissance et les mouvements des prolongements cellulaires de la microglie dans le cortex visuel [Davalos et al., 2005; Dissing-Olesen et al., 2014; Li et al., 2012; Nimmerjahn et al., 2005], et la réduction de l'activité neurale chez les souris élevées dans le noir diminue la motilité des processus microgliaux [Tremblay et al., 2010]. De plus, l'augmentation ou la diminution de l'activité du cortex visuel modifie la fréquence et la durée des contacts entre la microglie et les synapses, ainsi que la phagocytose d'éléments ressemblant à des synapses [Tremblay et al., 2010; Wake et al., 2009]. Ainsi, la microglie contrôle le développement des synapses en fonction de l'activité neuronale. Par ailleurs, elle est importante pour le bon fonctionnement des synapses : chez les souris $CX3CR1^{-/-}$, la maturation des synapses est anormale durant le développement, mais se rétablit ensuite lorsque la densité de cellules microgliales se normalise [Hoshiko et al., 2012; Paolicelli et al., 2011]. L'une des voies moléculaires aboutissant à l'élagage synaptique par la microglie passe par le complément. Nous le détaillerons dans le Paragraphe I.A.6.c.

Il y a aujourd'hui un grand nombre d'arguments en faveur d'une action de la microglie dans le développement embryonnaire. Cependant, il reste à établir à quel point

les actions de la microglie que nous venons d'évoquer sont générales, ou spécifiques à un type de neurones donné dans une zone du cerveau particulière, à un stade de développement précis.

I.A.5.b.ii Fonctions développementales de la microglie dans le cerveau adulte

Certaines études montrent un rôle bénéfique de la microglie dans la neurogenèse adulte (les modalités de la neurogenèse adulte sont détaillées Paragraphe I.C). Par exemple, une étude *in vitro* a montré que la microglie favorise la migration des neuroblastes et leur différenciation en neurones grâce à des facteurs solubles [Aarum et al., 2003]. La co-culture de neurosphères issues de cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire avec de la microglie (ou un milieu conditionné par la microglie) permet de restaurer la neurogenèse (qui, sans microglie, s'arrête) [Walton et al., 2006]. *In vivo*, Bachstetter et al. [2011] ont montré que la perturbation du signal entre fractalkine et CX3CR1 diminue la prolifération des progéniteurs et la survie dans le gyrus dentelé *via* l'IL-1. Selon ces données, la microglie régulerait la neurogenèse hippocampique de manière proneurogénique *via* son récepteur CX3CR1. La microglie est également impliquée dans la phagocytose physiologique des neuroblastes produits en excès [Sierra et al., 2010], à travers le récepteur *tyrosine kinases Mer and Axl* [Fourgeaud et al., 2016].

Cependant, comme souvent, l'action de la microglie est ambiguë, et certaines études lui trouvent un effet anti-neurogénique. Gebara et al. [2013] ont modulé la neurogenèse hippocampique physiologiquement chez la souris : l'activité physique (course volontaire dans une roue) augmente la neurogenèse, tandis que le vieillissement la diminue. En comptant les cellules microgliales dans ces différentes conditions, ils ont trouvé que le nombre de cellules progénitrices et la prolifération cellulaire sont inversement corrélés au nombre de cellules microgliales dans le gyrus dentelé . Des cultures de cellules souches neurales hippocampiques en présence de différentes concentrations de microglie donnent le même résultat. Ainsi selon cette étude, la microglie semblerait inhiber la neurogenèse adulte.

L'influence de la microglie sur la neurogenèse adulte en conditions inflammées est détaillée Paragraphe I.C.6.c.

I.A.6 Implication du complément

I.A.6.a La cascade du complément

Le système du complément est composé d'une série d'enzymes protéolytiques du sérum appartenant au système immunitaire inné et adaptatif. Il existe trois voies d'ac-

tivation du complément qui diffèrent par le facteur initiateur (Figure I.8) [Abbas et al., 2015].

— **La voie classique** commence par la fixation du complexe C1q sur des anticorps eux-mêmes fixés sur un antigène. Elle fait dans ce cas partie de l'immunité adaptative. Les C1r et C1s se fixent ensuite au C1q pour former le complexe protéolytique C1 et initier la cascade du complément en clivant C2 et C4.

— **La voie des lectines** débute par la fixation d'une lectine (*Mannose-Binding Lectin* (MBL) ou ficoline) sur les glycoprotéines à la surface de micro-organismes. Elle fait donc partie de l'immunité innée. Dans le cas de la MBL, un complexe de protéines de sérum appelé *MBL-associated serine protease* se fixe alors et déclenche la cascade du complément en clivant C2 et C4 de manière similaire à la voie classique.

— **La voie alterne** est initiée par la fixation covalente du complément C3b à la surface d'un micro-organisme. Elle fait donc partie de l'immunité innée. Le C3b est issu du clivage du C3, qui peut être obtenu par la voie classique ou la voie des lectines, ou bien par hydrolyse spontanée en C3(H_2O) suivie par la fixation du facteur FB qui, clivé par le facteur FD, produit le complexe protéolytique C3(H_2O)Bb. Ce dernier peut à son tour cliver d'autres protéines C3 [Merle et al., 2015].

Suite à l'une de ces trois activations, on obtient un complexe protéolytique C3 convertase (C4b2b dans le cas des voies classique et lectine, C3bBb dans le cas de la voie alterne) capable de cliver le C3. Celui-ci peut soit se fixer au micro-organisme ayant initié la cascade (rétrocontrôle positif de la voie alterne) pour provoquer l'opsonisation et l'élimination du micro-organisme par phagocytose ; soit former le complexe protéolytique C5 convertase (C4b2b3b ou C3bBbC3b) capable de cliver le C5 et permettre la fixation séquentielle sur C5b de C6, C7, C8 et C9 (Figure I.8). Le polymère de C9 forme un canal appelé *Membrane Attack Complex* (MAC) dans la membrane du pathogène, conduisant à son hydrolyse [Abbas et al., 2015].

I.A.6.b Complément et neuroinflammation

Plusieurs études ont montré que le complément est impliqué dans la réponse inflammatoire du système nerveux central, et notamment dans les dommages tissulaires liés à l'inflammation [Alexander et al., 2008; Ricklin and Lambris, 2013]. En effet le blocage du C3 ou de C5a atténue les dommages liés à l'inflammation et la neurodégénérescence [Elvington et al., 2012; Fonseca et al., 2009, 2011] mais aussi la sclérose en plaques [Ramaglia et al., 2012], l'ischémie [Mocco et al., 2006] et le traumatisme crânien [Neher et al., 2014; Rich et al., 2016] . En pratique, l'action du complément est ambiguë dans le système nerveux central, entre inflammation , régénération et neuroprotection [Alexander et al., 2008]. Par exemple, le C5a est neuroprotecteur envers le

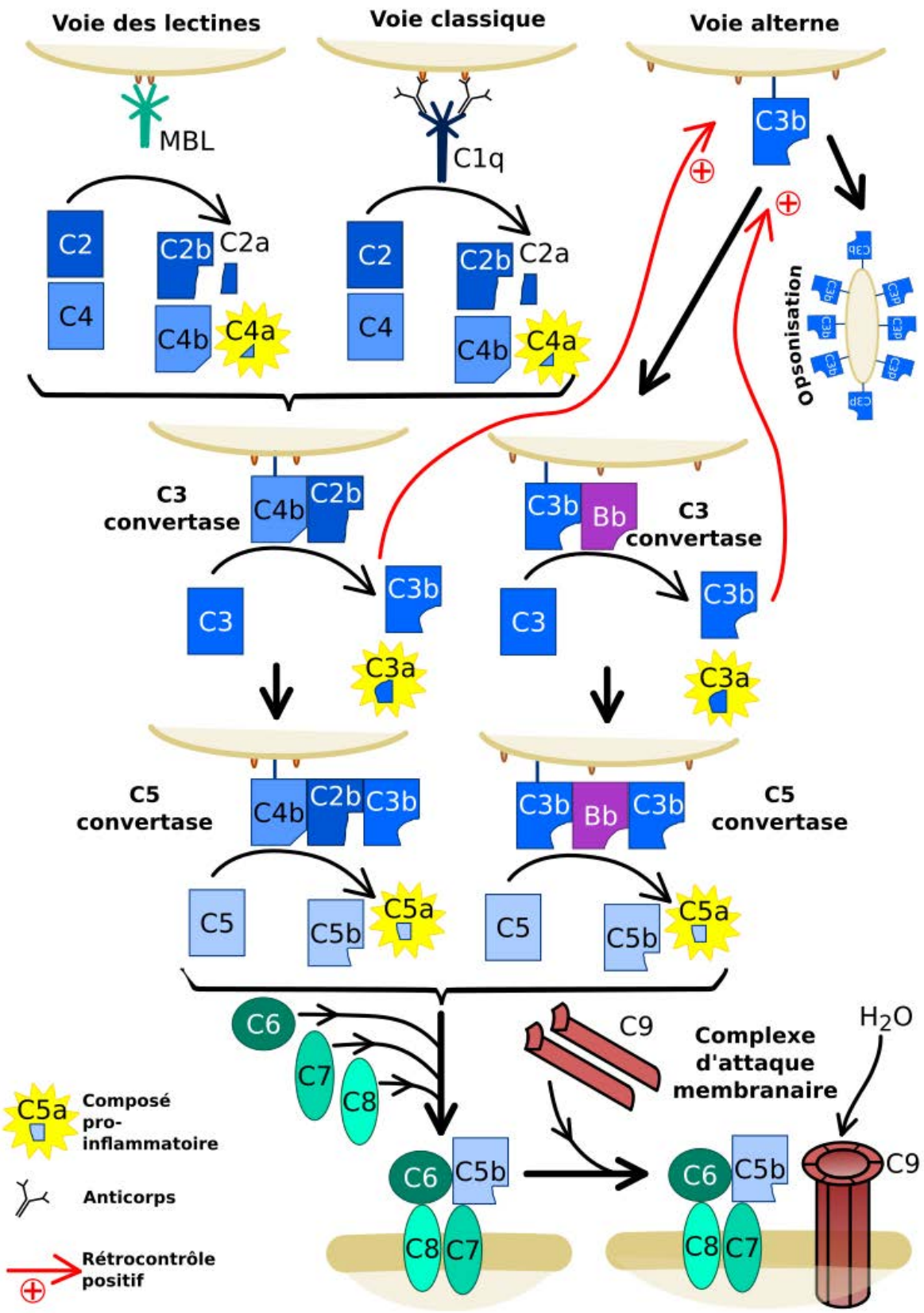


FIGURE I.8 – Le C3 comme pivot de la cascade du complément
Les trois voies sont parallèles, mais ont en commun la formation d'une enzyme **C3 convertase** liée à la membrane. La formation de C3b par clivage de C3 permet à la fois l'amplification de la voie alterne, et la continuation de la cascade (**C5 convertase)** qui aboutira *in fine* à la formation du complexe d'attaque membranaire et l'hydrolse de la cellule-cible. L'opsonisation par le C3b et l'action pro-inflamamtoire des facteurs diffusibles C3a, C4a et C5a permettent le recrutement de cellules immunitaires.

peptide amyloïde Aβ pour les neuroglioblastomes humains différenciés [O'Barr et al., 2001].

I.A.6.c Le complément dans le développement cérébral

Lors du développement embryonnaire, un grand nombre de synapses sont formées, et certaines sont ensuite éliminées [Katz and Shatz, 1996].

L'existence d'une période critique post-natale dans la mise en place du réseau du tractus visuel fait de ce dernier un bon modèle d'étude de la plasticité synaptique dépendant de l'activité [Chen and Regehr, 2000; Hong and Chen, 2011; Jaubert-Miazza et al., 2005]. Plusieurs études ont montré l'implication du complément C1q dans l'élimination des synapses surnuméraires dans le tractus optique en développement, notamment dans le noyau géniculé latéral du thalamus. Le C1q est exprimé au niveau des synapses en formation par les cellules ganglionnaires de rétine (qui projettent dans le noyau géniculé latéral) [Stevens et al., 2007], et dans le cortex [Stephan et al., 2012]. Le C3 est également exprimé de manière régulée dans l'espace et le temps dans le cortex et le noyau géniculé latéral pendant le développement [Stevens et al., 2007], ce qui suggère que le complément C3 pourrait avoir un rôle développemental.

L'implication du complément a été plus précisément montrée par des mesures neuroanatomiques et électrophysiologiques dans des souris C1q$^{-/-}$ et C3$^{-/-}$: C1q et C3 modulent le raffinement des synapses rétinogéniculées [Stevens et al., 2007]. L'expression de C1q dans les cellules ganglionnaires de rétine est induite par la sécretion de TGFβ par les astrocytes alentours et ce facteur est nécessaire pour l'élimination de synapses et la ségrégation des signaux provenant des deux yeux chez la souris [Bialas and Stevens, 2013].

Ainsi, l'élimination des synapses réticulogéniculées surnuméraires se fait grâce à un réseau complexe formé par les neurones, les astrocytes et la microglie [Kouser et al., 2015]. Cependant, le schéma reste pour l'instant incomplet. L'implication de la microglie dans la phagocytose des synapses marquées par le C1q n'a pas été formellement démontrée. De plus, on peut penser qu'il existe un facteur sécrété par les neurones en activité qui inhibe la sécrétion du TGFβ par les astrocytes, et ce facteur reste à déterminer. Enfin, le C1q étant une molécule sécrétée, il doit se fixer spécifiquement aux synapses les moins actives pour agir comme signal pour la phagocytose de ces synapses. Une hypothèse attrayante est que le C1q se fixerait sur certaines glycoprotéines de la membrane synaptique [Linnartz et al., 2012; Linnartz-Gerlach et al., 2014].

I.A.6.d Le complément dans la neurogenèse adulte

Très peu d'études se sont intéressées au rôle du complément dans la neurogenèse adulte. On peut citer le travail de Rahpeymai et al. [2006] montrant que lorsque le

récepteur au C3a (C3aR) est bloqué par un antagoniste, le nombre de neuroblastes produits par la zone sous-ventriculaire et la zone sous-granulaire est réduit de 20 à 30 %, et les néo-neurones présents dans le bulbe olfactif et le gyrus dentelé sont réduits de 25 %. Il en est de même chez les souris $C3^{-/-}$ et $C3a^{-/-}$ comparées aux contrôles immunocompétents.

I.B Olfaction et bulbe olfactif

I.B.1 De l'odeur au bulbe olfactif

I.B.1.a Les molécules odorantes

Pour être odorante et donner lieu à une représentation mentale, une molécule doit être volatile (ce qui implique un faible poids moléculaire), afin d'atteindre la cavité nasale dans l'air. De plus, elle doit être relativement soluble dans l'eau tout en étant fortement lipophile (et donc peu polarisée) [Ohloff, 1994]. En revanche, il n'est pas nécessaire qu'elle possède des fonctions chimiques particulières, et les molécules odorantes sont très variées (alcools, aldéhydes, cétones...). Cependant, la présence de certains groupes fonctionnels peut conférer des propriétés particulières : par exemple, un groupement thiol S-H donne souvent une odeur souffrée caractéristique et désagréable [Li and Liberles, 2015].

L'odeur d'une molécule n'est pas déterminée par sa configuration spatiale : certaines molécules structurellement très proches ont des odeurs ressenties très différentes, alors que des molécules très différentes peuvent avoir des odeurs similaires. Par ailleurs, certains énantiomères ont des odeurs proches (comme le limonène$^{(+)}$ et le limonène$^{(-)}$, qui sentent respectivement l'orange et le citron), alors que d'autres ont des odeurs très différentes (par exemple la carvone$^{(+)}$ a une odeur perçue d'herbe ou de graine de carvi, alors que le carvone$^{(-)}$ sent la menthe verte) [Laska and Teubner, 1999].

I.B.1.b Les récepteurs aux molécules odorantes

Les récepteurs olfactifs sont avant tout des récepteurs à des molécules chimiques. Leur expression [2] n'est donc pas confinée à l'épithélium olfactif, mais a été retrouvée dans un large champ de types cellulaires où ces récepteurs remplissent des fonctions variées comme le chimiotactisme dans les testicules, la détection d'épices dans l'intestin ou encore le développement dans les muscles stiés squelettiques [Kang and Koo, 2012]. Nous nous contenterons ici d'aborder leur rôle dans l'olfaction.

2. La découverte de la famille multigénique à l'origine des récepteurs olfactifs a valu à Buck et Axel [Buck and Axel, 1991] le prix Nobel de physiologie-médecine en 2004.

Les récepteurs olfactifs sont des protéines à 7 domaines transmembranaires couplées à une protéine G, exprimés à la surface des cils des neurones récepteurs olfactifs qui bordent le fond de la cavité nasale [Mombaerts, 1999]. Les molécules odorantes sont transportés dans l'air jusqu'à la cavité nasale. Des protéines appelées *Olfactory Binding Protein*, présentes dans le mucus qui recouvre l'épithélium olfactif, fixent la molécule odorante et la transportent à travers le mucus jusqu'aux récepteurs olfactifs [Meierhenrich et al., 2004].

Il existe une certaine permissivité dans l'association entre molécule odorante et récepteur olfactif : chaque récepteur peut fixer plusieurs molécules, et chaque molécule odorante peut se fixer à plusieurs récepteurs. Cela permet, par un jeu combinatoire, d'encoder un très grand nombre d'odeurs.

Suite à la fixation de la molécule odorante sur son récepteur, une cascade moléculaire est déclenchée, mettant en jeu l'AMP cyclique comme second messager et conduisant à l'activation de canaux Na^+/Ca^{2+}, ainsi qu'à l'ouverture de canaux Cl^- dépendants du Ca^{2+} [Silva Teixeira et al., 2016]. Un courant électrique est créé, il se propagera le long de l'axone du neurone récepteur olfactif jusqu'au bulbe olfactif. Les neurones récepteurs olfactifs exprimant le même récepteur olfactif projettent tous sur les mêmes glomérules, formant ainsi une carte des odeurs au niveau du bulbe olfactif [Mori and Sakano, 2011].

Il existe une importante neurogenèse adulte dans l'épithélium olfactif, renouvelant continuellement les neurones récepteurs olfactifs à partir de cellules souches [Brann and Firestein, 2014].

I.B.2 Réseau neuronal du bulbe olfactif

Dans les glomérules, les axones des neurones récepteurs olfactifs forment des synapses avec les cellules de projection du bulbe olfactif : cellules mitrales (dont le corps cellulaire est dans la couche mitrale) et cellules en touffe (dont le soma est dans la couche plexiforme externe) (Figure I.10). La majorité des neurones du bulbe olfactif sont des interneurones inhibiteurs : cellules granulaires et cellules périglomérulaires. Ils seraient 50 à 100 fois plus nombreux que les cellules mitrales [Egger and Urban, 2006; Isaacson and Strowbridge, 1998].

Les cellules granulaires sont GABAergiques, et forment des synapses réciproques dendro-dendritiques [3] avec les cellules mitrales (Figure I.16). La synapse cellule mitrale → cellule granulaire est glutamatergique excitatrice, tandis que la synapse cellule granulaire → cellule mitrale est GABAergique inhibitrice. Le grand nombre de synapses

3. Les cellules granulaires ont la particularité de ne pas avoir d'axone. Elles sont cependant polarisées : les dendrites basales jouent le rôle de dendrites classiques, tandis que la dendrite apicale joue le rôle d'axone (Figure I.16).

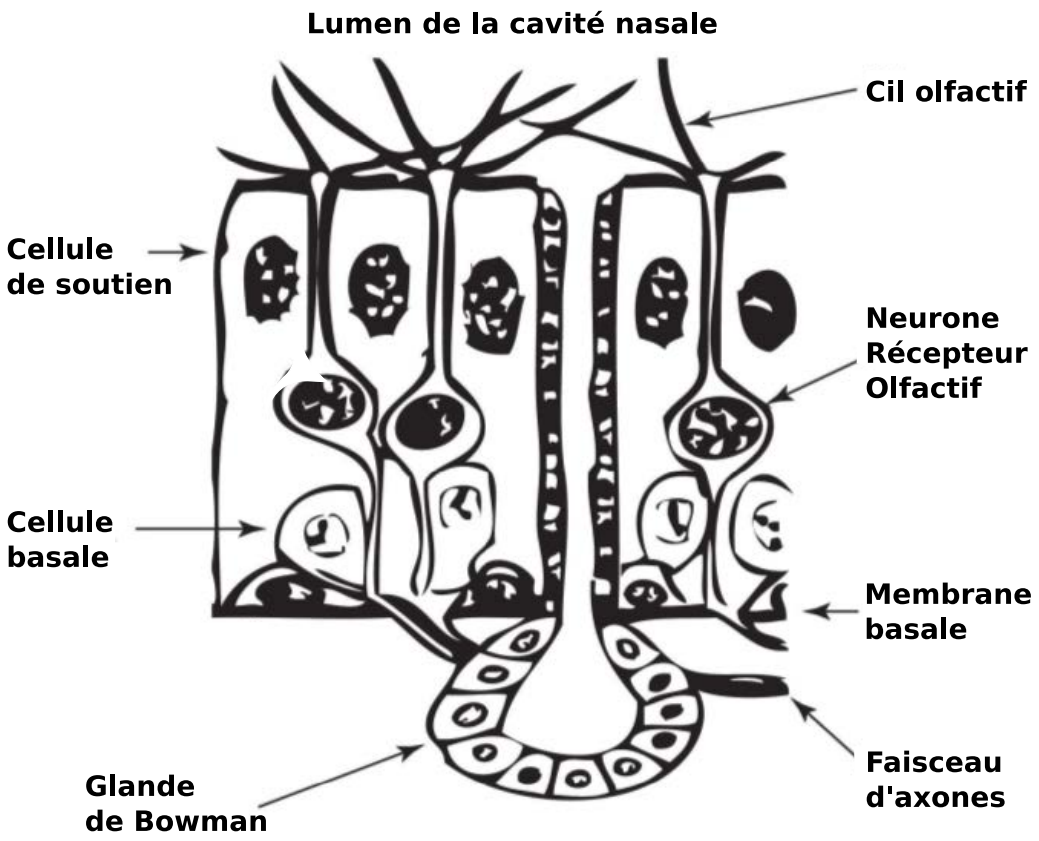


FIGURE I.9 – Organisation schématique de l'épithélium olfactif.
Les neurones récepteurs olfactifs sont en contact avec les molécules odorantes de l'air dans la cavité nasale. Ils sont protégés des aggressions par le mucus sécrété par les glandes de Bowman et par les cellules de soutien. Les cellules basales sont les cellules souches neurales et progéniteurs des neurones récepteurs olfactifs. Figure adaptée de Mackay-Sim [2010].

inhibitrices sur les cellules projectrices du bulbe olfactif pourrait être un mécanisme de raffinement de la représentation des odeurs [Lepousez and Lledo, 2013; Mori et al., 1999].

Les cellules périglomérulaires sont très hétérogènes, et il existe divers classements en fonction de plusieurs critères [Kosaka and Kosaka, 2005; Ying et al., 2012] dont voici quelques exemples :

— **Immunoréactivité** : toutes les cellules périglomérulaires sont GABAergiques, mais certaines expriment aussi la dopamine (montrée par l'immunoréactivité à TH). De plus parmi les GABAergiques non dopaminergiques, on peut distinguer les cellules exprimant la calrétinine (CalR) et celles exprimant la calbindine (CalB) [Kiyokage et al., 2010]

— **Morphologie** : les cellules périglomérulaires contactant principalement un unique glomérule sont qualifiées d'uniglomérulaires. D'autres contactent plusieurs glomérules (5 à 10, oligoglomérulaires) tandis que les dernières contactent un grand nombre de glomérules (polyglomérulaires) (voir Figure I.10). Schématiquement, les uniglomérulaires correspondent aux cellules périglomérulaires GABAergiques

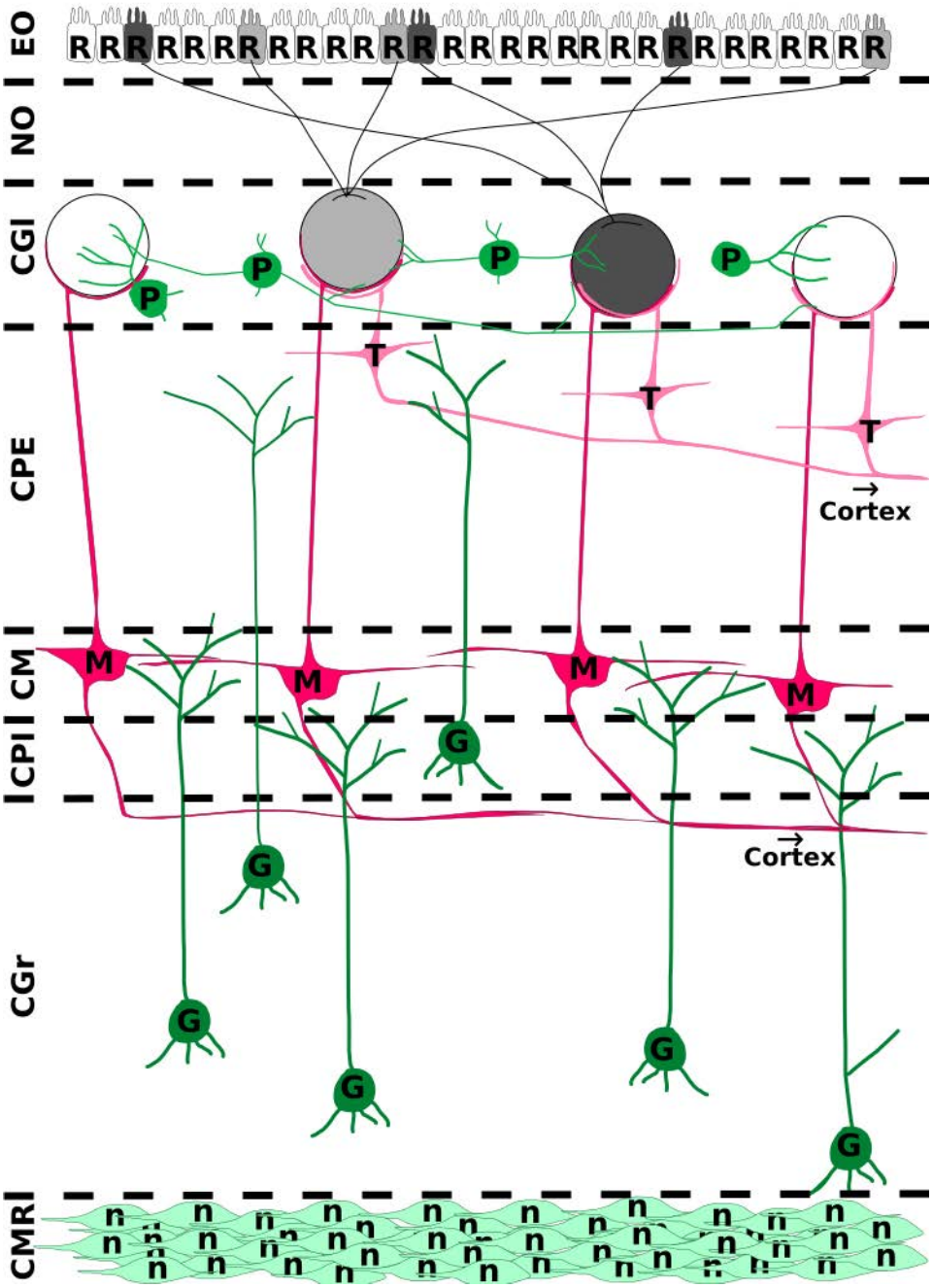


FIGURE I.10 – Réseau schématique du bulbe olfactif.
Dans chaque glomérule (large cercle), les axones des neurones récepteurs olfactifs (**R**) d'un même type contactent les dendrites principales des cellules mitrales (**M**) et cellules en touffe (**T**), qui projettent vers le cortex olfactif. Le réseau est modulé par des interneurones : cellules granulaires (**G**) et cellules périglomérulaires (**P**). Le courant de migration rostral (**CMR**) contient des neuroblastes (**n**) en migration tangentielle qui donneront naissance à des néo-neurones granulaires et périglomérulaires. **CGr** : couche des grains ; **CPI** : couche plexiforme interne ; **CM** : couche mitrale ; **CPE** : couche plexiforme externe ; **CGl** : couche glomérulaire ; **NO** : nerf olfactif ; **EO** : épithélium olfactif.

seulement, alors que les oligo- et polyglomérulaires correspondent à celles exprimant aussi la dopamine. Kiyokage et al. [2010] émettent la proposition que les cellules polyglomérulaires correspondraient à ce qui est traditionnellement nommé *Short axon cells*.

— **Interaction avec le nerf olfactif** : certaines cellules périglomérulaires forment des synapses dendrodendritiques avec les cellules en touffe ainsi que des synapses directes avec le nerf olfactif (type 1) ; d'autres en revanche n'ont que des synapses dendrodendritiques (type 2) [Kosaka et al., 1996; Toida et al., 1998, 2000]. Il semble que ces deux types soient représentés dans chacune des catégories présentées plus haut [Kiyokage et al., 2010], à l'exception des polyglomérulaires qui seraient seulement de type 2.

I.B.3 Projections du bulbe olfactif

Chaque cellule mitrale et cellule en touffe a une unique dendrite primaire dans un seul glomérule, c'est-à-dire qu'elle semble traiter les informations provenant d'un seul type de récepteur olfactif (Figure I.10). Ces deux types de cellules forment deux voies parallèles de projection sur le cortex olfactif [Haberly and Price, 1977], apportant chacune des informations différentes [Griff et al., 2008; Nagayama et al., 2004]. Comparées aux cellules mitrales, les cellules en touffe ont un seuil de réponse aux odeurs inférieur, une plus grande gamme de réponse aux différentes concentrations d'odeurs, une fréquence de décharge plus élevée et une plus forte résolution temporelle [Mori and Sakano, 2011]. Ainsi, les odeurs faiblement concentrées n'activent que la voie des cellules en touffe.

Les cellules en touffe et les cellules mitrales projettent vers les zones les plus antérieures du cortex olfactif (Figure I.11) : noyau olfactif antérieur, cortex piriforme antérieur et tubercule olfactif. Dans chacune de ces zones, les axones des deux types cellulaires arrivent dans des zones distinctes [Mori and Sakano, 2011]. Les cellules mitrales projettent aussi sur les zones plus postérieures du cortex olfactif, telles que le *tenia tecta*, le cortex piriforme postérieur, le noyau du tractus olfactif latéral, les noyaux antérieur et postérieur du cortex de l'amygdale, et le cortex entorhinal latéral. [Heimer, 1968; Neville and Haberly, 2004]. Les cellules mitrales et cellules en touffe du bulbe olfactif accessoire ne projettent pas sur les même zones que celles du bulbe olfactif principal, mais sur le noyau amygdaloïde médian et le noyau amygdaloïde cortical postéromédial [Neville and Haberly, 2004].

Les différentes régions du cortex olfactif reçoivent des projections différentes [Miyamichi et al., 2011] et codent des informations différentes. Nous allons l'illustrer à travers quelques exemples. Des études anatomiques du noyau olfactif antérieur ont montré une organisation topographiquement bien définie des projections des cellules mitrales et cellules en touffe selon l'axe dorso-ventral de la carte glomérulaire [Schoenfeld and Macrides, 1984; Yan et al., 2008]. Les neurones de la partie la plus rostrale du noyau olfactif antérieur peuvent détecter la localisation d'une source d'odeur en comparant les signaux provenant des narines ipsi- et contra-latérale [Kikuta et al., 2010]. Dans

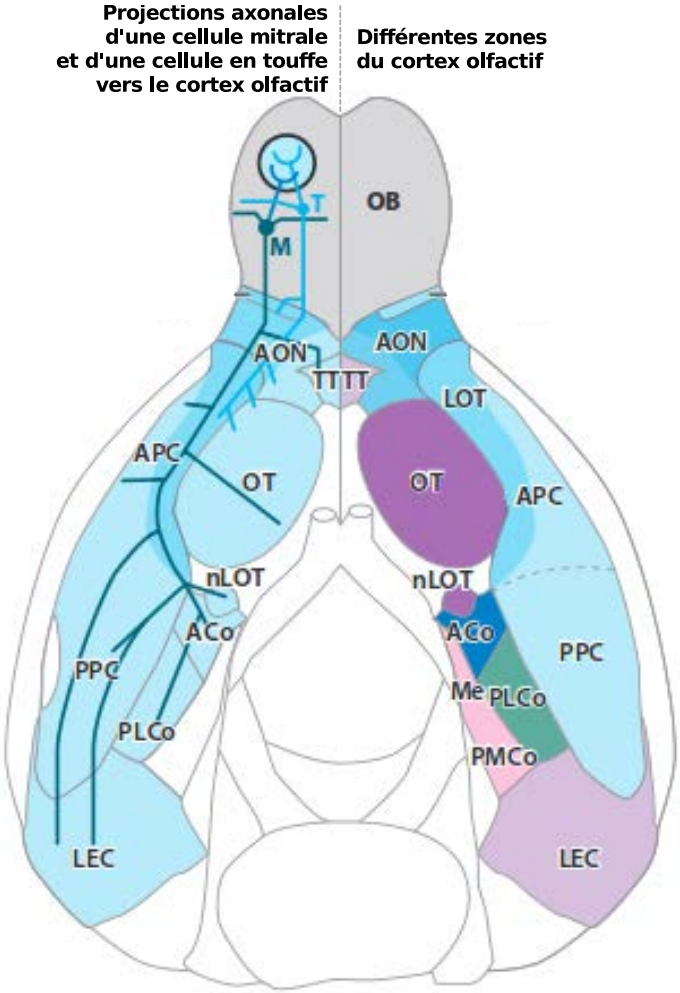


FIGURE I.11 – Projections sur les différentes parties du cortex olfactif.
À gauche, représentation schématique des projections axonales d'une cellule mitrale (M) et d'une cellule en touffe (T) sur les différentes régions du cortex olfactif, colorées en bleu. À droite, détail des différentes régions du cortex olfactif. On peut y voir le *tenia tecta* (TT) ; le noyau olfactif antérieur (AON) ; le cortex piriforme antérieur (APC) et postérieur (PPC) ; le tractus olfactif (OT) et le noyau du tractus olfactif latéral (nLOT) ; les noyaux antérieur (ACo), postérieur médial (PMCo) et postérieur latéral (PLCo) du cortex de l'amygdale ; le noyau de l'amygdale médiale (Me) ; le cortex entorhinal latéral (LET) ; le tubercule olfactif (OT). Adapté de [Mori and Sakano, 2011].

le cortex piriforme au contraire, les projections axonales des cellules mitrales semblent être peu denses et se recouper fortement [Illig and Haberly, 2003; Neville and Haberly, 2004; Stettler and Axel, 2009]. Cette convergence des signaux provenant de plusieurs glomérules sur un même neurone cortical pourrait être importante pour le traitement des odeurs dans le cortex piriforme [Haberly, 2001].

Les cellules pyramidales de projecion du cortex piriforme projettent (entre autres) directement sur le cortex orbitofrontal. L'olfaction se distingue en cela des autres sens : l'information sensorielle atteint le cortex préfrontal en seulement trois synapses (une dans les glomérules, une dans le cortex piriforme et une dans le cortex orbitofrontal). Cependant, il existe aussi une voie parallèle de projection entre cortex piriforme et cortex orbitofrontal plus classique, passant par le thalamus (noyau médiodorsal) [Wilson

et al., 2014].

I.B.4 Projections vers le bulbe olfactif

Le bulbe olfactif reçoit deux types d'afférences centrifuges : des projections neuromodulatrices, et des projections de diverses zones du cortex olfactif (dont le noyau olfactif antérieur, le cortex piriforme, le *tenia tecta*, le noyau du tractus olfactif latéral et les noyaux du cortex de l'amygdale). La plupart des résultats que nous allons détailler dans cette partie ont été obtenus chez le rat.

I.B.4.a Fibres centrifuges neuromodulatrices

— **Noradrénaline** : Le bulbe olfactif reçoit des projetions noradrénergiques du *locus cœruleus* [McLean et al., 1989; Shipley et al., 1985] selon un gradient du centre vers l'extérieur du bulbe olfactif (innervation la plus forte dans la couche des grains et la plus faible dans la couche glomérulaire. L'influx noradrénergique désinhibe les cellules mitrales et les cellules en touffe directement [Hayar et al., 2001] ou *via* l'inhibition des cellules granulaires [Jahr and Nicoll, 1982]. Par conséquent, les cellules mitrales répondent à de faibles stimulations du nerf olfactif, proches du seuil de perception, sans affecter la réponse aux fortes stimulations [Jiang et al., 1996]. Cependant, de manière surprenante, la noradrénaline diminue l'entrée sensorielle en agissant de manière pré-synaptique sur les neurones récepteurs olfactifs au niveau des glomérules [Eckmeier and Shea, 2014]. Ces effets de la noradrénaline pourraient être en lien avec la modulation de la perception en fonction de l'attention.

— **Sérotonine** : Les noyaux du Raphé médian et dorsal projettent abondamment sur tout le bulbe olfactif [McLean and Shipley, 1987]. Le noyau du Raphé médian innerve principalement la couche glomérulaire [Won et al., 1998], tandis que le noyau du raphé dorsal innerve plutôt la couche des grains [Steinfeld et al., 2015]. Au niveau comportemental, la suppression des fibres sérotoninergiques du bulbe olfactif grâce à une toxine spécifique chez le rat adulte provoque la perte de la capacité de discrimination olfactive dans une tâche apprise avant la suppression, ainsi que l'atrophie du nerf olfactif et de la couche glomérulaire [Moriizumi et al., 1994]. Ainsi, la sérotonine pourrait agir comme facteur trophique pour les fibres du nerf olfactif [Matsutani and Yamamoto, 2008].

— **Acétylcholine** : des fibres cholinergiques provenant principalement du prosencéphale basal innervent tout le bulbe olfactif, et plus abondamment la couche glomérulaire chez le rat [Ichikawa and Hirata, 1986; Ojima et al., 1988]. Les fibres cholinergiques forment des synapses avec les cellules périglomérulaires et les cellules granulaires [Kasa et al., 1995], mais les modalités de l'action de l'acétylcholine

sur des cellules granulaires (*via* le récepteur muscarinique ou nicotinique) sont débattues [Castillo et al., 1999; Pressler et al., 2007]. Les cellules périglomérulaires et les cellules mitrales sont activées *via* le récepteur muscarinique [Castillo et al., 1999; Rothermel et al., 2014]. Le blocage de la transmission par le récepteur muscarinique chez le rat détériore la rétention de la mémoire olfactive à court terme [Ravel et al., 1994], tandis que le blocage de la transmission nicotinique abolit la discrimination spontanée entre deux odeurs chimiquement proches [Mandairon et al., 2006]. L'innervation cholinergique semble avoir une action sur la neurogenèse adulte car les néo-neurones granulaires sont directement apposés aux fibres cholinergiques [Whitman and Greer, 2007], et l'activation du récepteur nicotinique de ces neurones augmente la mort cellulaire [Mechawar et al., 2004].

— ***γ-aminobutyric acid* (GABA)** : Des fibres GABAergiques du prosencéphale basal innervent tout le bulbe olfactif [Shepherd and Greer, 1998], et particulièrement la couche plexiforme interne et la couche des grains [Gracia-Llanes et al., 2010]. Les neurones cibles de cette innervation sont exclusivement GABAergiques : cellules périglomérulaires de type 1 (voir I.B.2), et cellules granulaires, ce qui synchronise l'inhibition bulbaire et donc la réponse des cellules mitrales et des cellules en touffe [Gracia-Llanes et al., 2010]. L'interruption de cette voie provoque un défaut de discrimination olfactive de molécules proches [Nunez-Parra et al., 2013].

Une des caractéristiques communes de toutes ces fibres neuromodulatrices centrifuges est la présence de varicosités – lieu de synapses potentielles – tout au long de leurs axones, ce qui suggère une action diffuse de neuromodulateurs dans tout le bulbe olfactif. Au contraire, les projections centrifuges corticales que nous allons maintenant détailler semblent avoir des cibles beaucoup plus précises, ce qui pourrait dénoter un contrôle cortical du comportement en fonction d'odeurs précises [Matsutani and Yamamoto, 2008].

I.B.4.b Fibres centrifuges corticales

Des projections d'origines très variées dans le cortex olfactif innervent le bulbe olfactif : elles proviennent entre autres du noyau olfactif antérieur, du cortex piriforme, du *tenia tecta*, du noyau du tractus olfactif latéral et des noyaux du cortex de l'amygdale [Davis et al., 1978; De Carlos et al., 1989; de Olmos et al., 1978; Price and Powell, 1970b; Reyher et al., 1988].

Le type de neurotransmetteur impliqué dans ces projections corticales n'est pas toujours connu. Dans le cas des synapses sur les dendrites proximales des cellules granulaires, que l'on pense être les principales cibles, les signaux centrifuges sont glutamatergiques excitateurs [Lepousez et al., 2014; Sassoé-Pognetto et al., 2003]. De plus, ces

synapses sont exclusivement assymétriques (contrairement aux synapses entre cellules granulaires et cellules mitrales) [Price and Powell, 1970a; Reyher et al., 1988].

La majorité des projections corticales innervent principalement la couche des grains, et certaines innervent la couche plexiforme externe ou la couche glomérulaire [Davis and Macrides, 1981; Luskin and Price, 1983]. Au sein de la couche des grains, les projections du cortex piriforme, *tenia tecta*, noyau du tractus olfactif latéral et noyau du cortex de l'amygdale se retrouvent principalement dans les parties profondes de la couche. Comme les cellules granulaires profondes sont principalement connectées aux cellules mitrales, il semblerait que cette innervation centrifuge influence principalement le réseau des cellules mitrales [Matsutani and Yamamoto, 2008].

Les fonctions des projections centrifuges corticales sont encore mal connues. Les projections centrifuges du cortex orbitofrontal *via* le cortex piriforme sont probablement importantes dans l'appréciation de la valence des odeurs [Schoenbaum and Eichenbaum, 1995a,b]. Ainsi, la réponse des cellules mitrales varie en fonction de la valence attendue de l'odeur [Kay and Laurent, 1999] et la réponse aux odeurs de nourriture varie en fonction de la satiété [Pager, 1978; Pager et al., 1972].

I.C Neurogenèse adulte

I.C.1 Petit historique

Les neuroanatomistes, dont Santiago Ramón y Cajal, ont longtemps pensé que le système nerveux était fixe et incapable de régénérescence. Joseph Altman a été le premier à évoquer la possibilité de la création de neurones dans le système nerveux central des mammifères adultes, lorsqu'il a constaté que, suite à une ischémie, des cellules neuronales étaient marquées de thymidine tritiée [Altman, 1962]. Il montra ensuite la présence de neurogenèse adulte dans le gyrus dentelé chez le rat et le chat [Altman, 1963; Altman and Das, 1965], puis dans le bulbe olfactif [Altman, 1969]. C'est dans cette publication qu'il introduit et nomme le courant de migration rostral.

Ces travaux ont été très largement ignorés par la communauté scientifique, jusqu'à ce que d'autres équipes montrent au début des années 1980 la présence de neurogenèse adulte chez le rat [Bayer, 1982; Bayer et al., 1982] et le canari [Goldman and Nottebohm, 1983]. Depuis, la présence de neurogenèse adulte a été prouvée dans de nombreuses espèces [Amrein, 2015].

I.C.2 Rappels sur la neurogenèse embryonnaire

Nous évoquerons dans cette partie quelques notions sur le développement embryonnaire du cerveau utiles pour comprendre la neurogenèse adulte.

Lors des premiers stades de l'embryogenèse, un axe antéro-postérieur et un axe dorso-ventral sont mis en place. La gastrulation forme ensuite trois feuillets dans l'embryon : de l'extérieur vers l'intérieur il s'agit de l'ectoderme, du mésoderme et de l'endoderme. Le long de l'axe dorsal au dessus de la corde, l'ectoderme se spécialise en neuroectoderme. C'est le repliement de ce neuroectoderme, lors de la neurulation, qui va donner le tube neural à l'origine du système nerveux central. Le centre creux du tube donnera les ventricules dans la partie antérieure et le canal épendymaire de la moelle épinière dans la partie postérieure [Stiles and Jernigan, 2010].

La partie antérieure du tube neural, qui donnera naissance au cerveau, se subdivise en cinq parties antéro-postérieurement :

— **le télencéphale** dans la partie antérieure donnera le cortex et les ventricules ;
— **le diencéphale** formera les vésicules optiques et les ganglions de la base et le 3e ventricule ;
— **le mésencéphale** donnera le tegmentum et le tectum ;
— **le métencéphale** est à l'origine du cervelet ;
— **le myélencéphale** dans la partie la plus postérieure donnera le tronc cérébral et le 4e ventricule.

La neurogenèse commence une fois la neurulation achevée, lorsque le tube neural est entièrement formé. Les cellules souches neurales sont situées au bord de la lumière du tube, c'est-à-dire des ventricules et du canal épendymaire, et sont appelées glies radiaires [Barry et al., 2014]. Elles se divisent à un rythme peu soutenu, et donnent naissance à des progéniteurs intérmédiaires qui, eux, se divisent énormément. Les progéniteurs neuronaux intermédiaires peuvent donner naissance à des neuroblastes, mais aussi à des astrocytes et des oligodendrocytes. Les glies radiaires servent également de substrat à la migration des neuroblastes corticaux [Florio and Huttner, 2014]. La formation des couches neuronales du cortex se fait de l'intérieur vers l'extérieur : la première couche formée est la plus proche du ventricule, et les neurones en migration dépassent les neurones déjà en place [Angevine and Sidman, 1961].

Cette migration radiale le long des glies radiaires concerne les neurones glutamatergiques. Les interneurones inhibiteurs du cortex, quant à eux, naissent dans les éminences ganglionnaires (dans la zone ventrale du télencéphale) et migrent tangentiellement sur de longues distances jusqu'à atteindre leur position finale dans le cortex [Kelsom and Lu, 2013; Sultan et al., 2013].

La neurogenèse adulte, comme nous allons le détailler dans la suite, garde certaines caractéristiques de la neurogenèse embryonnaire. La neurogenèse hippocampique produit majoritairement des neurones excitateurs et ressemble donc par de nombreux

aspects à la neurogenèse corticale (cellules souches ressemblant à des glies radiaires, migration radiale le long de la glie). La neurogenèse subventriculaire, en revanche, rappelle plutôt la formation des interneurones corticaux (cellules souches non radiaires, longue migration tangentielle).

I.C.3 Les niches neurogéniques dans le cerveau adulte des rongeurs

La neurogenèse adulte a lieu dans trois zones bien précises du cerveau adulte, que l'on appelle niches neurogéniques : la zone sous-ventriculaire , le gyrus dentelé et de manière moins connue l'hypothalamus [Yuan and Arias-Carrión, 2011].

Ces niches, composées de différents types cellulaires (neurones, astrocytes, cellules endothéliales...), créent l'environnement approprié pour maintenir les cellules souches neurales dans un état quiescent et non-différencié [Morrison and Spradling, 2008].

Il existe actuellement de plus en plus d'éléments sur l'existence de neurogenèse adulte en dehors de ces zones [Feliciano et al., 2015], mais nous nous contenterons ici d'évoquer les données concernant les niches neurogéniques bien établies.

Pour ce qui concerne la neurogenèse adulte dans l'espèce humaine, voir I.C.7.

I.C.3.a Hypothalamus

Des niches de progéniteurs neuronaux ont été trouvées assez récemment dans l'hypothalamus [Maggi et al., 2015]. La première mention de cellules proliératives (incorporant du BrDU dans l'hypothalamus de rats adultes) date de moins de 15 ans [Evans et al., 2002]. La niche neurogénique de ces néo-neurones est située dans la paroi du 3e ventricule [Xu et al., 2005]. De là, les néo-neurones migrent dans le parenchyme de l'hypothalamus ventral, mais peuvent être recrutés dans d'autres régions de l'hypothalamus suite à une lésion [Cheng, 2013]. Les cellules souches neurales à l'origine de cette neurogenèse ne sont pas de type astrocytaire, mais des épendymocytes particuliers (appelés tanycytes), dont les prolongements vont jusqu'à l'hypothalamus [Lee et al., 2012].

I.C.3.b Gyrus dentelé de l'hippocampe

Le gyrus dentelé de l'hippocampe est la structure la plus étudiée à ce jour en ce qui concerne la neurogenèse adulte. Ses cellules souches neurales sont situées à la base de la zone granulaire du gyrus dentelé, c'est pourquoi on appelle cette niche zone sous-granulaire. Des cellules ressemblant à des glies radiaires (cellules de type 1) donnent naissance à des cellules souches neurales de type 2 non radiaires, qui génèrent elles-même des progéniteurs neuronaux (type 3). Ces trois types cellulaires sont capables de

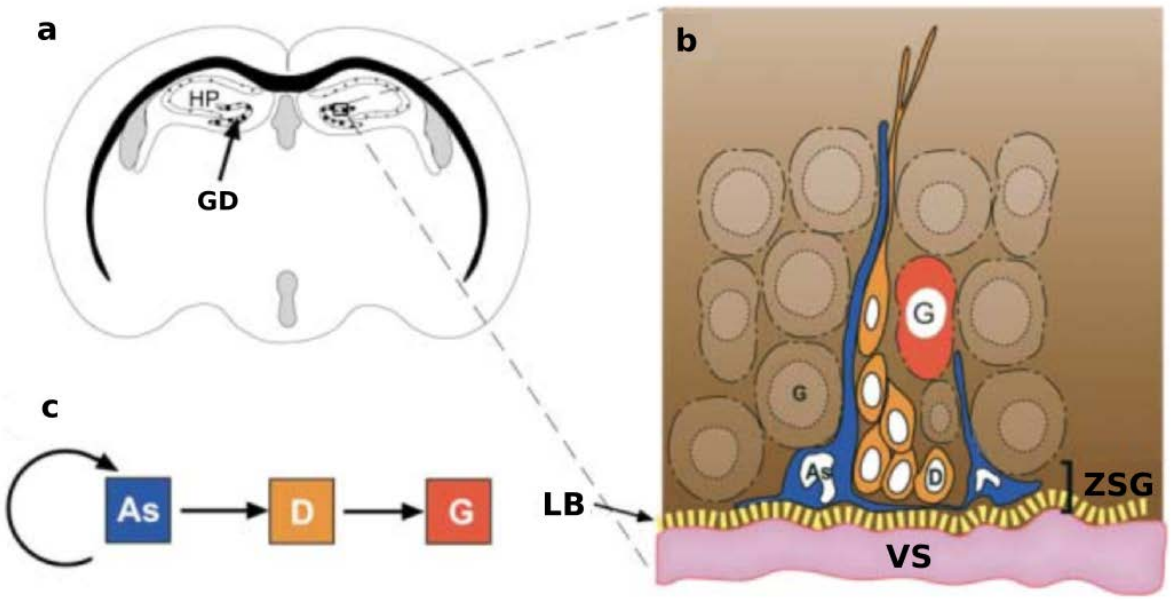


FIGURE I.12 – Neurogenèse dans le gyrus dentelé de l'hippocampe.
(a), localisation du gyrus dentelé (GD) dans l'hippocampe (HP) sur une coupe coronale de cerveau de souris adulte. (b), organisation schématique de la niche : les cellules souches As dans la zone sous-granulaire (ZSG) donnent naissance à des progéniteurs neuronaux D qui maturent et migrent le long du prolongement des astrocytes AS, pour donner des cellules en grain du gyrus dentelé matures G. Les cellules souches sont en contact avec la lame basale (LB) qui entoure des vaisseaux sanguins (VS). (c), représentation schématique du lignage cellulaire : les cellules As peuvent s'auto-renouveler et donner naissance aux cellules D, qui donnent elles-mêmes les cellules G. Figure adaptée de Alvarez-Buylla and Lim [2004].

se diviser asymétriquement (un nombre fini de fois dans le cas des progéniteurs), ce qui leur permet de générer une cellule du même type, et une du type suivant (Figure I.12) [Varela-Nallar and Inestrosa, 2013]. Les progéniteurs neuronaux donnent ainsi naissance à des neuroblastes (environ 9000 par jour chez le rat, selon Cameron and McKay [2001]), qui sont déjà engagés dans la voie de différenciation en neurones et sont post-mitotiques. Parallèlement à leur différenciation, les néo-neurones migrent plus profondément dans la couche granulaire, pour donner enfin des cellules en grain du gyrus dentelé. Cependant la moitié des neuroblastes sont éliminés avant d'atteindre l'âge d'un mois [Varela-Nallar and Inestrosa, 2013].

Pour approfondir, on pourra consulter les revues Alvarez-Buylla and Lim [2004], Ming and Song [2005] et Varela-Nallar and Inestrosa [2013].

I.C.3.c Zone sous-ventriculaire

La zone sous-ventriculaire borde les deux ventricules latéraux. Elle contient des cellules souches neurales appelées cellules de type B1. Ce sont des astrocytes provenant des glies radiaires et pouvant être soit quiescentes, soit activées [Codega et al., 2014]. Une fois activées, ces cellules donnent naissance à des progéniteurs neuronaux se divisant rapidement (cellules de type C), qui produisent à leur tour des neuroblastes

(cellules de type A, Figure I.13) [Doetsch et al., 1997]. Ces derniers vont ensuite migrer jusqu'au bulbe olfactif en passant par le courant de migration rostral (voir I.C.4).

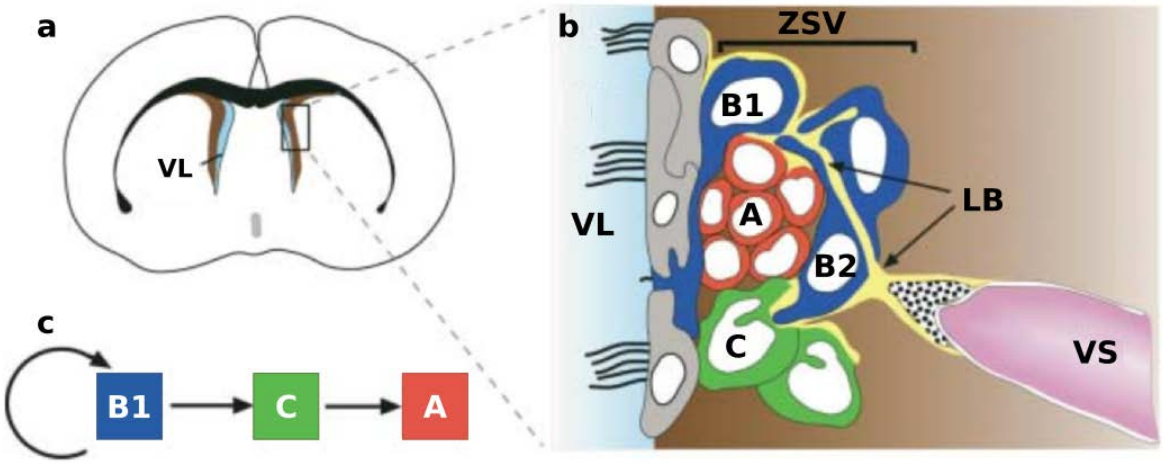


FIGURE I.13 – Neurogenèse dans la zone sous-ventriculaire.
(a), localisation de la zone sous-ventriculaire le long du ventricule latéral (LV), sur une coupe coronale de cerveau de souris adulte. (b), organisation schématique de la niche : les cellules souche B1 côté ventricule latéral (LV), les astrocytes de soutien B2 côté striatum et les progéniteurs neuronaux C entourent les neuroblastes A. La lame basale (BL) des vaisseaux sanguins (VS) est fortement enchevêtrée avec toutes les cellules de la niche. (c), représentation schématique du lignage cellulaire : les cellules B1 peuvent s'auto-renouveler et donner naissance aux cellules C, qui donnent elles-mêmes les cellules A. Figure adaptée de Alvarez-Buylla and Lim [2004].

Dans la zone sous-ventriculaire comme dans le gyrus dentelé, les cellules souches neurales présentent des caractéristiques structurelles et moléculaires d'astrocytes, notamment l'expression de la *Glial Fibrillary Acidic Protein* ou GFAP [Doetsch et al., 1999; Imura et al., 2003; Laywell et al., 2000; Seri et al., 2001]). Il existe deux types d'astrocytes dans la zone sous-ventriculaire : les cellules souches neurales B1 situées entre le ventricule et les neuroblastes C ; et les cellules de type B2, qui n'ont pas d'activité neurogénique et sont situées entre les neuroblastes C et le striatum (Figure I.13).

L'activité neurogénique des progéniteurs semble déterminée par des signaux propres à la niche neurogénique : des cellules de zone sous-ventriculaire transplantées dans la zone sous-ventriculaire d'une autre souris donnent naissance à des néo-neurones dans le bulbe olfactif de la souris receveuse ; lorsque les cellules sont transplantées dans une zone non-neurogénique, leur production de neurones est très limitée [Gage, 2000; Lim et al., 2000]. Les astrocytes B2 semblent avoir un rôle primordial dans les propriétés de la niche : des cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire (cellules de type B1 et C) cultivées sans sérum et en contact direct avec une monocouche d'astrocytes prolifèrent et forment des neuroblastes [Lim and Alvarez-Buylla, 1999]. De manière similaire, des facteurs solubles et membranaires dérivés d'astrocytes favorisent la prolifération et la différenciation en neurones des cellules souches hippocampiques [Song et al., 2002]. Ainsi, les astrocytes B2 ne sont pas neurogéniques, mais participent au micro-environnement qui stimule la neurogenèse.

Comme souvent pendant le développement, la maintenance et la différenciation des cellules souches de la zone sous-ventriculaire est conditionnée par la présence d'une lame basale. La lame basale de la zone sous-ventriculaire est riche en laminine et en collagène-1, et est associée à un tissu connectif périvasculaire comprenant des fibroblastes et des macrophages [Mercier et al., 2002]. Selon Mercier et al., la lame basale pourrait concentrer ou moduler les cytokines et les facteurs de croissance sécrétés par les cellules alentour. Des vaisseaux sanguins entourés de lame basale sont fortement interdigités avec toutes les cellules de la zone sous-ventriculaire, particulièrement les cellules de type B1. Les cellules souches neurales sont situées à proximité de la vasculature, et expriment le récepteur à la laminine, l'intégrine-α6. Lorsque l'on bloque ce récepteur à l'aide d'un anticorps, les cellules souches neurales s'éloignent de la lame basale et leur prolifération est augmentée d'un tiers [Shen et al., 2008]. Ainsi, la lame basale est une composante essentielle de la zone sous-ventriculaire, à la fois comme ancrage et comme régulateur de prolifération. Certaines des cellules de type B1 sont en contact avec le ventricule, soit en s'intercalant entre les épendymocytes, soit grâce à un prolongement appelé cil primaire [Shen et al., 2008]. Ce cil primaire est nécessaire à la prolifération des cellules B1 [Doetsch et al., 1997]. Ainsi, les cellules B1 sont directement en contact avec le liquide cérébro-spinal riche en hormones et facteurs de croissance dont, par exemple, l'insuline et les *Insulin-Like Growth Factor* (IGF) [Ziegler et al., 2015] et Hedgehog [Tong et al., 2014], qui participent à l'homéostasie des cellules souches neurales [Lim and Alvarez-Buylla, 2014].

La zone sous-ventriculaire contient des sous-régions qui donnent naissance à des types neuronaux différents. Ainsi, les cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire dorsale génèrent principalement des cellules granulaires superficielles et des cellules périglomérulaires dopaminergiques alors que la zone ventrale genère des cellules granulaires profondes et des cellules périglomérulaires CalB$^+$ [Merkle et al., 2007]. Récemment, quatre nouveaux sous-types de cellules granulaires ont été décrits, associés à des zones spécifiques de la zone sous-ventriculaire antérieure et antéro-ventrale [Merkle et al., 2014]. Ces spécifications régionales de la zone sous-ventriculaire sont mises en place dès le stade embryonnaire E11.5, et sont maintenues jusqu'à l'âge adulte [Fuentealba et al., 2015].

Dans cette thèse, nous avons principalement étudié les cellules granulaires situées dans la couche des grains profonde, car elles sont plus homogènes morphologiquement que les cellules granulaires de la couche des grains superficielle (Figure I.14).

Nous n'entrerons pas ici dans le détail des facteurs qui déterminent la mosaïque des destinées des cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire ; pour plus de précisions, consultez Gengatharan et al. [2016]

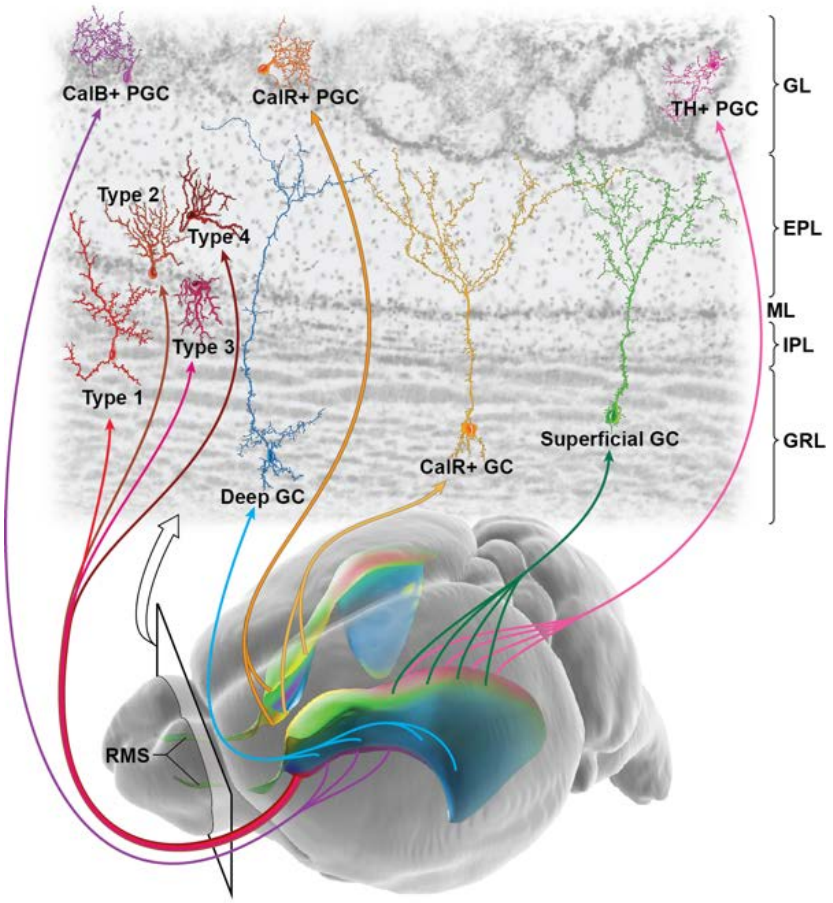


FIGURE I.14 – Sous-régions de la zone sous-ventriculaire.
La zone sous-ventriculaire n'est pas homogène, et produit des interneurones de types différents selon les zones. CalR+ GC : cellule granulaire à CalR ; CalB+ GC : cellule granulaire à CalB ; PGC : cellule périglomérulaire ; Deep / Superficial GC : cellule granulaire profonde / superficielle ; GRL : couche des grains ; IPL : couche plexiforme interne ; ML : couche mitrale ; EPL : couche plexiforme externe ; GL : couche glomérulaire. Figure tirée de Lim and Alvarez-Buylla [2014].

I.C.4 Migration des néo-neurones bulbaires

I.C.4.a Migration tangentielle

Plus de 30 000 neuroblastes arrivent dans le bulbe olfactif *via* le courant de migration rostral chaque jour chez la souris [Alvarez-Buylla et al., 2001]. Lois and Alvarez-Buylla ont été les premiers à étudier la migration des néo-neurones nés dans la zone sous-ventriculaire [Lois and Alvarez-Buylla, 1994]. Ils ont décrit en particulier la migration tangentielle des néo-neurones. De manière similaire à la migration durant la neurogenèse embryonnaire, les neuroblastes ont une morphologie bipolaire et migrent à une vitesse moyenne de 30 $\mu m.h^{-1}$, ce qui leur permet de parcourir les 5 mm qui les séparent du bulbe olfactif en 5 à 7 jours (Figure I.15) [Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002]. Dans le courant de migration rostral, les neurones migrent en chaîne continue, au sein d'une structure tubulaire formée par des astrocytes

spécialisés [Jankovski and Sotelo, 1996]. Cette gaine d'astrocytes joue un rôle essentiel dans la migration [Kaneko et al., 2010; Snapyan et al., 2009]. Des neuroblastes cultivés sur une monocouche d'astrocytes provenant du bulbe olfactif ou du courant de migration rostral migrent, alors qu'ils restent immobiles en présence d'astrocytes corticaux [García-Marqués et al., 2010]. Par ailleurs, la rupture de la gaine d'astrocytes dans différentes lignées transgéniques de souris altère la migration des neuroblastes [Anton et al., 2004; Belvindrah et al., 2007; Chazal et al., 2000]. Les astrocytes GFAP$^+$ du courant de migration rostral sont issus des glies radiaires embryonnaires [Alves et al., 2002]. Certains gardent des propriétés de cellule souche neurale et peuvent générer des interneurones bulbaires [Alonso et al., 2008; Gritti et al., 2002; Merkle et al., 2007].

La migration cellulaire se fait en 3 grandes étapes (Figure I.15B) :

1. avancée du cône de croissance situé à l'avant du neuroblaste ;
2. positionnement du centrosome dans le processus avant ;
3. translocation du noyau vers la position du centrosome.

La migration des neuroblastes est régulée par un ensemble complexe de facteurs intrinsèques et extrinsèques [Capilla-Gonzalez et al., 2015]. En voici quelques exemples (Figure I.15) :

— **Dcx (doublecortine)** : la mutation de Dcx provoque un défaut de migration des cellules issues de la zone sous-ventriculaire *in vitro* [Ocbina et al., 2006] aussi bien qu'*in vivo* [Belvindrah et al., 2011; Kappeler et al., 2006; Koizumi et al., 2006] : le cône de croissance et la translocation nucléaire sont altérés.

— **NKCC1** : en jouant sur la concentration intracellulaire en ions et donc sur l'osmose, ce transporteur transmembranaire influe sur la forme de la cellule. Il est nécessaire au maintien de la vitesse de migration des neuroblastes dans le courant de migration rostral [Mejia-Gervacio et al., 2011].

— **PSA-NCAM** : cette molécule anti-adhésive exprimée à la surface des neuroblastes crée un environnement favorable à leur déplacement : elle éloigne les neurones en migration du tube glial qui les entoure, ce qui permet l'action d'autres récepteurs intercellulaires nécessaires au mouvement [Bonfanti and Theodosis, 1994; Hu et al., 1996; Yang et al., 1992].

— **Sonic Hedgehog** : cette protéine sécrétée est chimioattractante pour les neuroblastes en migration dans la zone sous-ventriculaire [Hor and Tang, 2010]. Le blocage de Sonic Hedgehog arrête la migration vers le bulbe olfactif alors que sa présence exogène déroute les neuroblastes vers la région d'expression de Sonic Hedgehog [Angot et al., 2008].

— **Slit-Robo** : Slit 1 et 2 sont exprimées dans le septum, et leur interaction avec la protéine Robo – exprimée par les neuroblastes –, provoque leur répulsion vers le

bulbe olfactif : dans les souris déficientes en Slit1, certains neuroblastes migrent caudalement [Nguyen-Ba-Charvet et al., 2004].

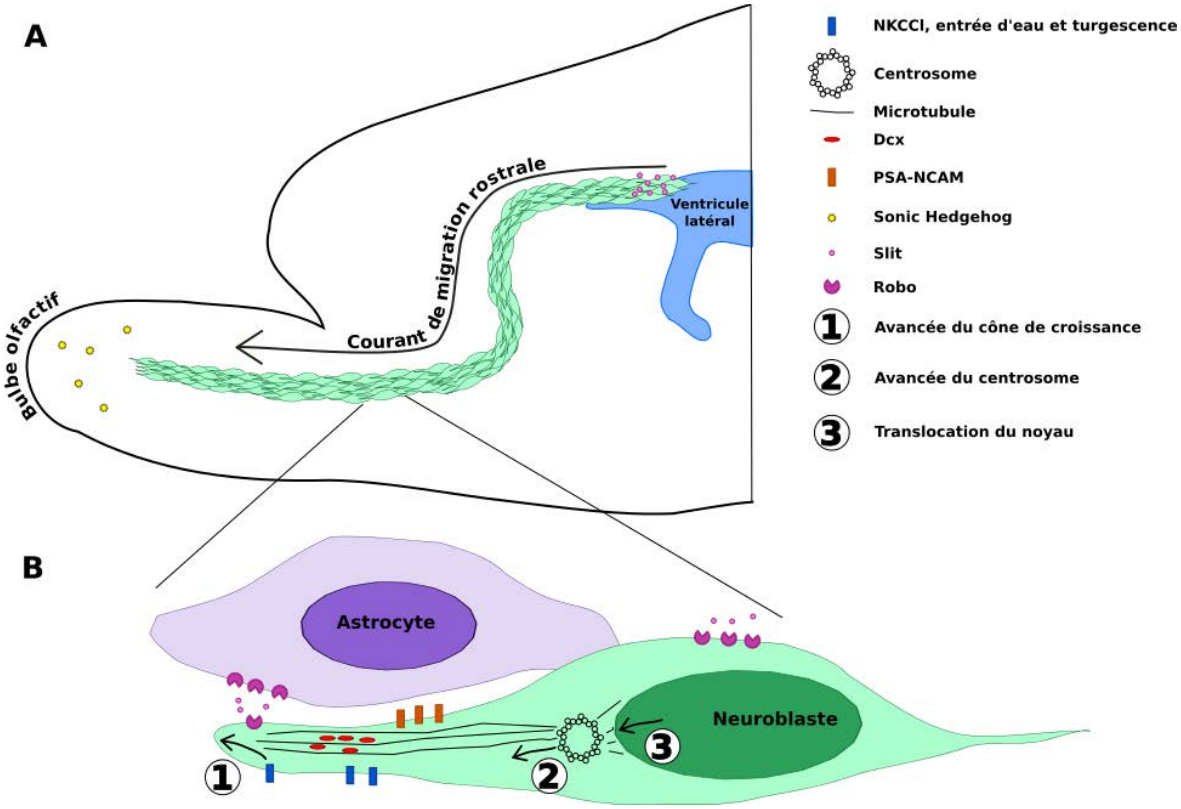


FIGURE I.15 – Migration des neuroblastes dans le courant de migration rostral.
(A), vue d'ensemble du courant de migration rostral sur une coupe sagitale de cerveau de souris ; le facteur attractif Sonic Hedgehog et le facteur répulsif Slit sont représentés. (B), détail du mécanisme d'avancée des neurones (1 à 3), et des molécules régulatrices de la migration ; NKCC1 et Dcx associée aux microtubules sont importants pour l'avancée du cône de croissance (1), puis du centrosome (2) et du noyau (3) ; PSA-NCAM régule l'adhérence avec la gaine d'astrocytes, tandis que la fixation de Slit et Robo dirige la migration vers le bulbe olfactif. Adapté de Capilla-Gonzalez et al. [2015]

.

I.C.4.b Migration radiale

Une fois arrivés dans le bulbe olfactif (5 à 7 jours), les néo-neurones changent de direction et se mettent à migrer radialement à travers les différentes couches du bulbe olfactif [Belvindrah et al., 2011; Hack et al., 2002; Saghatelyan et al., 2004; Saha et al., 2012]. La majorité s'arrête dans la couche des grains pour former des cellules granulaires, les autres continuent jusqu'à la couche glomérulaire pour donner des cellules périglomérulaires (jours 5 à 7 après leur génération dans la zone sous-ventriculaire selon Petreanu and Alvarez-Buylla [2002]) (Figure I.10).

La reeline est importante pour le détachement de la chaîne de migration tangentielle et l'initiation de la migration radiale : dans le mutant reeler, les neuroblastes s'amassent au lieu de se disperser dans tout le bulbe olfactif [Hack et al., 2002]. Réciproquement, la Plexine-B2 semble impliquée dans le maintien des neuroblastes dans le courant de

migration rostral : son expression est faible dans le bulbe olfactif et des neuroblastes déficients en Plexin-B2 quittent plus rapidement le courant de migration rostral et migrent plus loin radialement [Saha et al., 2012].

Cette dernière phase de migration peut être modulée. Par exemple, suite à une lésion des neurones dopaminergiques, les néo-neurones migrent préférentiellement vers la zone lésée du bulbe olfactif [Lazarini et al., 2014].

I.C.5 Différentiation et intégration des néo-neurones bulbaires

I.C.5.a Acquisition de la morphologie

Les cellules granulaires arrivées à leur place dans la couche des grains voient leur dendrite apicale s'allonger jusqu'à la couche mitrale sans branchement (jours 9 à 13), puis acquérir des branchements sans épines dans la couche plexiforme externe (jours 11-22) et enfin développer leurs épines de neurones matures (jours 15-30, Petreanu and Alvarez-Buylla [2002]). Pendant cette dernière phase d'acquisition des épines, la moitié des néo-neurones est éliminée. L'arborisation dendritique des cellules granulaires ainsi que leur densité d'épines atteignent leur maximum 30 jours après le marquage des neuroblastes dans le courant de migration rostral, puis décroit [Pallotto et al., 2012].

Les cellules périglomérulaires, quant à elles, n'acquièrent leur morphologie « mature » qu'après 1 à 3 mois [Livneh and Mizrahi, 2011]. On distingue deux types de cellules périglomérulaires (voir aussi page 24) : les neurones «épineux» (possédant de nombreuses épines dendritiques) et les «non-épineux» (très peu d'épines). Ces derniers ont une arborisation très labile pendant leur développement, tandis que chez les épineux l'arbre dentitique est beaucoup plus stable, mais les épines sont labiles [Mizrahi, 2007].

I.C.5.b Intégration dans le réseau bulbaire

Les cellules granulaires maturent et créent des connections avec le réseau bulbaire, d'abord en recevant des entrées axo-dendritiques sur la partie proximale du dendrite apical (Figure I.16) puis grâce à des synapses dendrodendritiques avec les cellules de projection du bulbe (cellules mitrales et cellules en touffe) [Panzanelli et al., 2009; Whitman and Greer, 2007]. Cette séquence est différente de celle observée durant le développement des neurones néonataux, où les synapses réciproques apparaissent en même temps que celles d'entrée simple [Kelsch et al., 2008]. Cette particularité du développement des néo-neurones est probablement due au fait qu'ils doivent s'intégrer dans un réseau déjà fonctionnel. On peut en effet supposer que des messages erratiques en sortie des néo-neurones immatures pourraient avoir des conséquences catastrophiques sur tout le réseau.

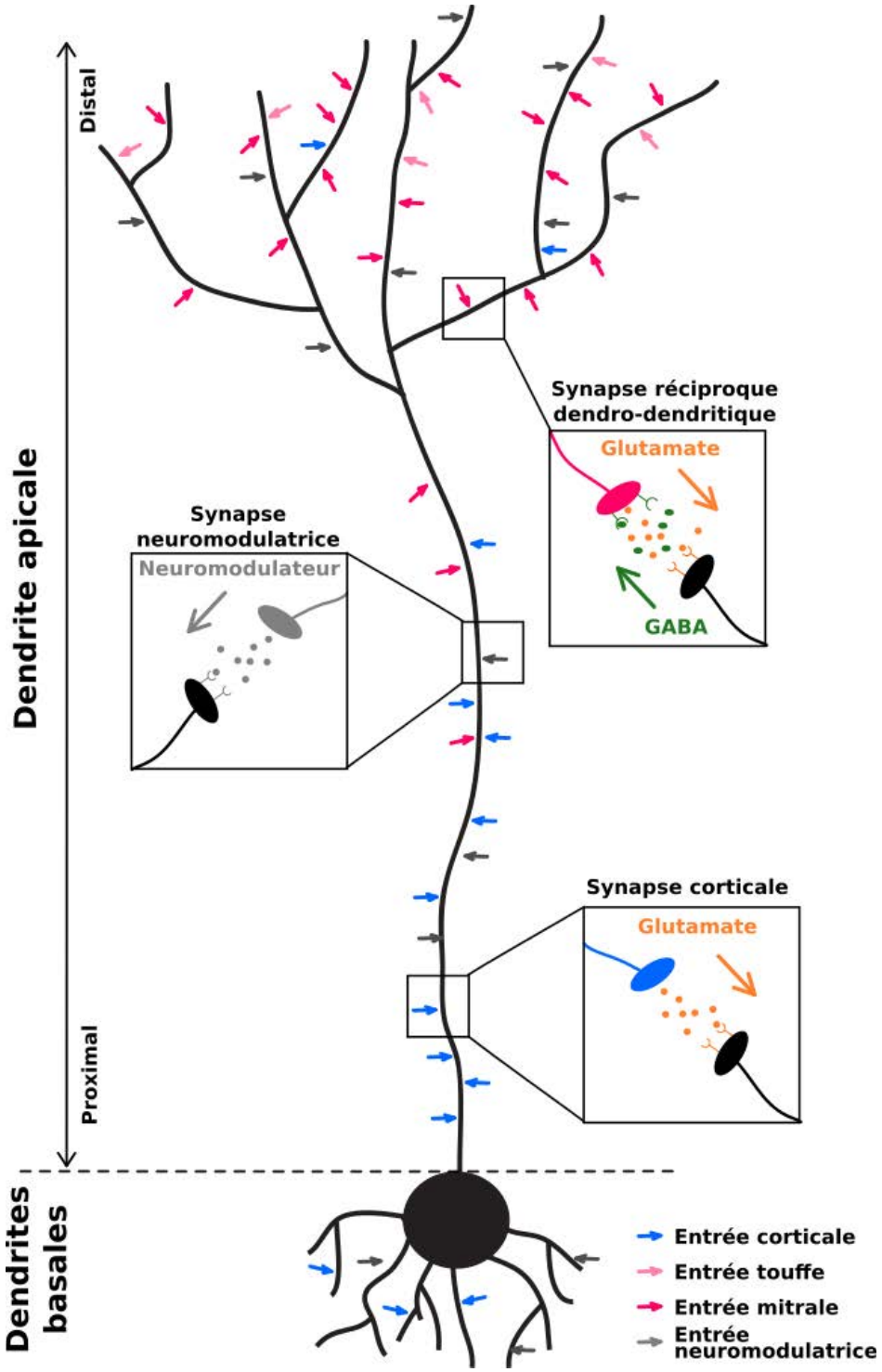


FIGURE I.16 – Schéma d'une cellule granulaire et ses connexions.
On distingue les dendrites basales et la dendrite apicale, ramifiée dans sa partie apicale. La cellule granulaire reçoit principalement des afférences corticales dans la partie proximale de la dendrite apicale, et forme des synapses réciproques avec les cellules mitrales et les cellules en touffe dans sa partie distale. Les projections neuromodulatrices (sérotonine, acétylcholine, noradrénaline, GABA... voir Paragraphe I.B.4.a) sont réparties sur tout l'arbre dendritique.

Il existe un biais dans l'intégration des cellules granulaires : celles issues de la neurogenèse adulte sont préférentiellement localisées dans la couche des grains profonde, tandis que celles issues de la neurogenèse embryonnaire sont plutôt dans la couche des

grains superficielle [Imayoshi et al., 2008; Lemasson et al., 2005; Sakamoto et al., 2014]. Or, il a été montré que les cellules granulaires superficielles établissent des synapses avec les cellules en touffe dans la partie extérieure de la couche plexiforme externe, tandis que les cellules granulaires profondes contactent préférentiellement les cellules mitrales [Imamura et al., 2006; Mori et al., 1983; Orona et al., 1983]. Une hypothèse possible est que ces deux populations de cellules granulaires ont des rôles différents. L'activité des cellules en touffe serait sous le contrôle préférentiel des cellules granulaires embryonnaires stables, tandis que les cellules granulaires issues de la neurogenèse adulte inhiberaient à la fois les cellules mitrales et les cellules en touffe [Sakamoto et al., 2014]. Cependant, même si cette hypothèse est séduisante, le tableau est probablement beaucoup plus complexe : malgré le biais d'intégration des néo-neurones, sur le long terme chez la souris la majorité des cellules granulaires sont remplacées un jour [Imayoshi et al., 2008].

I.C.6 Effets de l'environnement sur les néo-neurones

Comme nous l'avons déjà vu (I.C.3.c et Figure I.14), la position des néo-neurones et leur différenciation dépend de la région de la zone sous-ventriculaire où ils ont été générés [Merkle et al., 2007, 2014]. On peut considérer que cette prédétermination du destin des néo-neurones est intrinsèque. Plusieurs autres facteurs intrinsèques génétiques ont été mis en évidence [Kohwi et al., 2005; Saino-Saito et al., 2007; Waclaw et al., 2006].

Cependant, de nombreux facteurs extrinsèques peuvent également influer sur la différenciation des neuroblastes. C'est ce que nous allons détailler dans la partie suivante.

I.C.6.a Influence de l'entrée sensorielle

L'activité sensorielle olfactive est primordiale pour les néo-neurones à plusieurs niveaux.

— **Prolifération des cellules souches neurales** : un environnement enrichi en odeurs augmente la prolifération des cellules souches neurales dans la zone sous-ventriculaire et le courant de migration rostral, tandis qu'une lésion chimique des neurones récepteurs olfactifs n'augmente la prolifération que dans le courant de migration rostral [Alonso et al., 2008].

— **Migration des neuroblastes** : la tenascin-R, glycoprotéine de la matrice extracellulaire, est impliquée dans la migration radiale des neuroblastes. Or, la tenascin-R est produite par les cellules granulaires déjà présentes dans le bulbe olfactif, et cette production dépend des entrées sensorielles. Ainsi, sans stimulation olfactive, la migration radiale est diminuée [David et al., 2013; Saghatelyan et al., 2004].

— **Survie des néo-neurones** : la privation sensorielle diminue leur survie, tandis que l'enrichissemment olfactif l'augmente [Alonso et al., 2006; Livneh and Mizrahi, 2012; Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002; Rochefort et al., 2002; Sawada et al., 2011]. Il existe une période critique pour cette sensibilité, lorsque le néo-neurone a entre 14 et 28 jours d'âge [Yamaguchi and Mori, 2005]. Cette période recoupe la phase de développement des synapses avec les neurones pré-existants, ce qui suggère un rôle des entrées synaptiques dans la sélection des néo-neurones granulaires [Kelsch et al., 2008; Yokoyama et al., 2011].

— **Différenciation des néo-neurones** : l'activité sensorielle joue sur la nature des néo-neurones intégrés au réseau. Les cellules périglomérulaires dopaminergiques voient l'expression de l'enzyme TH régulée selon les entrées sensorielles [Bastien-Dionne et al., 2010; Bovetti et al., 2013; Lazarini et al., 2014]. Des souris de laboratoire élevées dans un milieu enrichi en odeurs ont proportionnellement plus de cellules périglomérulaires dopaminergiques que celles élevées de manière conventionnelle [4] [Bonzano et al., 2014].

— **Morphogenèse dendritique des néo-neurones** : la longueur et le nombre des dendrites des cellules granulaires sont diminués suite à une privation sensorielle, tandis qu'ils sont augmentés dans un milieu enrichi en odeurs [Saghatelyan et al., 2005; Yoshihara et al., 2012]. L'arbre dendritique et le nombre d'épines des cellules granulaires des souris mutantes pour le récepteur $GABA_A$ sont diminués, ce qui suggère que la transmission synaptique GABAergique est importante pour la formation de l'arbre dendritique et des épines [Pallotto et al., 2012].

— **Formation des épines des néo-neurones** : dans les cellules granulaires de souris dont l'olfaction est coupée, la formation d'épines dendritiques est diminuée dans le domaine distal, et est augmentée dans le domaine proximal [Kelsch et al., 2009, 2012b; Saghatelyan et al., 2005]. Chez les souris stimulées olfactivement, au contraire, la densité d'épines dans le domaine distal est augmentée [Breton-Provencher et al., 2014; Livneh et al., 2009]. L'activité neuronale induite par un stimulus odorant provoque la formation et la rétraction de filopodes dans la partie distale [5] des cellules granulaires via le récepteur NMDA [Breton-Provencher et al., 2014; Kelsch et al., 2012a]. L'un des mécanismes d'action de l'activité sensorielle sur les épines des néo-neurones passe par la CRH (*corticotropin-releasing hormone*), qui est produite par certains interneurones du bulbe olfactif dans la couche plexiforme externe en fonction de l'activité. La synaptogenèse sur les den-

4. Dans toutes les expériences de laboratoire, le milieu «enrichi» est toujours beaucoup moins riche que la nature (c'est-à-dire le milieu physiologique des souris, voir Paragraphe III.E.3). Par conséquent, énormément de résultats expérimentaux sont probablement biaisés par la pauvreté du milieu d'élevage des souris. Peut-être les souris vivant dans la nature ont-elles dix fois plus de cellules périglomérulaires dopaminergiques que toutes les estimations faites sur les souris de laboratoire ?

5. La plupart des études en microscopie biphotonique regardent les cellules périglomérulaires ou bien la partie distale des cellules granulaires pour des raisons techniques.

drites des cellules granulaires est ensuite accélérée *via* le récepteur à la CRH [Garcia et al., 2014]. Un stimulus plus puissant que le simple enrichissement, l'apprentissage olfactif (qui est actif, contrairement à l'enrichissement) augmente la densité d'épines dans la partie basale de l'arbre dendritique des cellules granulaires et favorise le remodelage des entrées excitatrices et inhibitrices sur cette région [Lepousez et al., 2014]. Une étude [Kelsch et al., 2012b] suggère que les synapses des cellules granulaires néonatales auraient une plus grande plasticité en réponse à des changement d'activité neuronale que celles des néo-neurones.

— **Activité des néo-neurones** : la production de GABA et de son enzyme de synthèse (*glutamic acid decarboxylase 67 : GAD67*) dans les interneurones du bulbe olfactif sont régulées par l'activité neuronale, et en particulier par les entrées sensorielles [Lau and Murthy, 2012; Parrish-Aungst et al., 2011]. Ainsi, l'inhibition par les interneurones du bulbe olfactif est régulée par l'activité sensorielle. Enfin, Livneh et al. [2014] ont montré grâce à des techniques d'enregistrement *patch* couplé à de l'imagerie à 2 photons que les jeunes néo-neurones périglomérulaires de 2 à 4 semaines répondent bien à des stimuli olfactifs. De plus, leur profil de réponse est plus large que celui des cellules périglomérulaires préexistants, et l'enrichissement en odeurs durant le développement des néo-neurones rend leur réponse plus sélective après maturation. Ainsi, l'apport continu en néo-neurones procure une grande plasticité et une grande adaptibilité au réseau.

I.C.6.b Influence des projections corticales

L'élimination des cellules granulaires par apoptose est favorisée durant la période post-prandiale, et est particulièrement corrélée à la durée du sommeil post-prandial chez la souris [Yokoyama et al., 2011]. Cette élimination est induite par des signaux centrifuges du cortex olfactif vers le bulbe olfactif [Komano-Inoue et al., 2014]. De plus, la privation sensorielle (par occlusion nasale) augmente encore l'élimination des cellules granulaires durant la période post-prandiale, et cet effet est contré par le blocage des entrées centrifuges. Ainsi, la survie des néo-neurones est régulée par une interaction complexe entre entrées sensorielles centripètes et retours corticaux centrifuges [Komano-Inoue et al., 2014; Yokoyama et al., 2011].

Des études utilisant des vecteurs viraux rabiques monosynaptiques (capables de passer d'un neurone post-synaptique à un neurone pré-synaptique) ont montré que les néo-neurones reçoivent des signaux glutamatergiques de la part du cortex olfactif [Arenkiel et al., 2011; Deshpande et al., 2013]. Ces signaux centrifuges sur les dendrites proximales des cellules granulaires contribuent à la survie des néo-neurones. Par ailleurs, les néo-neurones sont plus plastiques vis-à-vis des signaux centrifuges que ne le sont les neurones préexistants. Les projections corticales sur la partie proximale du dendrite apical des cellules granulaires sont renforcées suite à un apprentissage olfactif avec

renforcement positif [Lepousez et al., 2014]. Ainsi, les projections corticales semblent jouer un rôle dans l'apprentissage olfactif.

Les projections corticales influencent donc à la fois la survie, la morphologie, et le fonctionnement des néo-neurones.

I.C.6.c Influence de l'inflammation

Lorsque la microglie est activée par un stimulus microbien comme le LPS, la production de néo-neurones dans le gyrus dentelé est fortement diminuée, sans pour autant toucher la prolifération des cellules souches neurales ou le taux de neurones immatures (exprimant Dcx) [Ekdahl et al., 2003]. De plus, l'administration d'un anti-inflammatoire suffit à restaurer la neurogenèse adulte [Monje et al., 2003]. Ces résultats tendent à prouver que la microglie activée M1 diminue la survie des néo-neurones, ce qui est cohérent avec une étude ultérieure qui a montré le rôle actif de la microglie dans l'apoptose *in vivo*, toujours dans l'hippocampe adulte [Sierra et al., 2010, 2013]. Par ailleurs, le LPS augmente le nombre d'épines dendritiques fines et l'expression du marqueur post-synaptique *Post-Synatic Density 95* (PSD95) des néo-neurones [Chugh et al., 2013]. De plus, le LPS augmente l'expression du récepteur $GABA_A$ durant les stades précoces de la synaptogenèse, ce qui suggère un déséquilibre entre activation et inhibition chez ces néo-neurones [Chugh et al., 2013]. Enfin, le LPS empêche les néo-neurones de s'intégrer correctement dans le réseau hippocampique. Notamment, le co-marquage de BrDU avec le marqueur d'activation précoce Arc montre que les néo-neurones s'activent moins durant l'exploration spatiale [Belarbi et al., 2012]. Plusieurs médiateurs de l'action de la microglie sur les nouveaux neurones ont été proposés, comme par exemple IL-1, IL-6, le TNF-α ou les prostaglandines, car ils sont sécrétés par la microglie durant l'inflammation aiguë [Iosif et al., 2006; Monje et al., 2003; Russo et al., 2011; Yirmiya and Goshen, 2011].

Une fois la phase d'inflammation aiguë passée, lorsque l'élément l'ayant initiée n'est plus présent, la microglie peut développer un profil de cytokines anti-inflammatoires (transition de la polarisation M1 à M2, voir I.A.3.b). C'est le cas à la suite d'une stimulation par le LPS [Cacci et al., 2008]. Ce profil M2 peut être bénéfique pour les néo-neurones : par exemple, l'administration de la molécule anti-inflammatoire TGFβ est bénéfique dans la zone sous-ventriculaire [Mathieu et al., 2010b]. De plus, la microglie est importante pour la résolution de l'inflammation, en recrutant des cellules immunitaires périphériques [Frank-Cannon et al., 2009; Polazzi and Monti, 2010; Shechter et al., 2009], voire en recrutant des progéniteurs pour la réparation des tissus endommagés [Czeh et al., 2011; Mathieu et al., 2010a].

Cependant, si la microglie est activée de manière chronique, elle peut continuer à libérer des molécules neurotoxiques, notamment des dérivé réactif de l'oxygène au fort

pouvoir oxydant, ce qui pourrait être délétère pour les néo-neurones [Glass et al., 2010; Nathan and Ding, 2010; Polazzi and Monti, 2010; Rivest, 2011; Ron-Harel et al., 2011].

Les lésions épileptiques sont typiques de la complexité de l'interaction entre microglie et neurogenèse adulte : une forte crise d'épilepsie induit une augmentation forte et transitoire de la neurogenèse adulte [Parent et al., 1997], suivie par une diminution sous le niveau du contrôle à long terme [Hattiangady and Shetty, 2010]. L'activation microgliale est forte dans la zone sous-granulaire durant la phase aiguë post-épilepsie [Ekdahl et al., 2003], et elle est toujours présente bien que plus faiblement six mois plus tard [Bonde et al., 2006]. Les néo-neurones produits au moment de la crise épileptique sont toujours présents six mois plus tard, et sont entourés par la microglie chroniquement activée. La microglie pourrait donc ici avoir un rôle de soutien des néo-neurones. La sévérité de la crise épileptique est directement corrélée aux conséquences sur la neurogenèse hippocampique à long terme (alors que la phase aiguë est invariante) [Mohapel et al., 2004]. Comme une crise d'épilepsie initiale est suivie de crises spontanées tout au long de la vie de l'animal, il est possible que la microglie chroniquement activée soit en fait régulièrement ré-activée, voire que deux populations de cellules microgliales (activées de manière aiguë ou non) co-existent [Ekdahl, 2012].

Il a été récemment suggéré que l'effet positif de l'enrichissement sur la neurogenèse hippocampique (voir I.C.6.a pour les effets de l'enrichissement olfactif) passerait par un effet anti-inflammatoire du milieu enrichi [Sierra et al., 2014]. On sait depuis longtemps qu'un milieu enrichi augmente la neurogenèse hippocampique en agissant sur la survie des néo-neurones, ce qui provoque l'agrandissement du gyrus dentelé [Kempermann et al., 1997] et est accompagné d'un meilleur apprentissage spatial [Nilsson et al., 1999]. En cas d'inflammation, l'enrichissement est anti-apoptotique et neuroprotecteur [Young et al., 1999], et limite la réponse au LPS en diminuant l'expression de plusieurs cytokines et chimiokines dont IL-1β et TNF-α chez le rat [Williamson et al., 2012]. Cependant les effets de l'enrichissement ne semblent pas dépendre de la voie de signalisation par IL-1 car la neurogenèse est augmentée en milieu enrichi chez les souris IL-1R1$^{-/-}$ [Goshen et al., 2009]. L'enrichissement induit aussi la prolifération de la microglie et son expression du facteur proneurogénique IGF-1 [Ziv et al., 2006]. Cependant, le phénotype de la microglie n'est pas entièrement défini en milieu enrichi comparativement à l'hébergement classique, et les mécanismes moléculaires associés restent à déterminer.

En résumé, il semble que la microglie ait un rôle physiologique important dans la neurogenèse adulte (voir I.A.5.b.ii). Mais dès lors qu'elle est activée, son interaction avec les cellules souches neurales et les néo-neurones est complexe, avec des effets très variables selon le type et la durée de l'activation [Ekdahl, 2012; Ekdahl et al., 2009; Sierra et al., 2013].

I.C.6.d Influence des états mentaux

Beaucoup de travaux font le lien entre altération de la neurogenèse adulte hippocampique et troubles de l'humeur (anxiété, dépression, bipolarité...). Nous nous concentrerons ici plus précisément sur l'effet du stress et du phénotype anxio-dépressif qui en résulte.

Le stress, qui exacerbe les comportements anxio-dépressifs chez la souris et l'être humain, réduit la prolifération cellulaire dans le gyrus dentelé et induit la mort cellulaire ainsi que le rétrécissement des dendrites [Gould and Cameron, 1996; Mahar et al., 2014]. Des études en Imagerie par Résonnance Magnétique (IRM) ont également montré une diminution du volume de l'hippocampe accompagnée d'une perte neuronale chez les patients dépressifs [Fotuhi et al., 2012]. Non seulement les antidépresseurs restaurent le stock de progéniteurs et la neurogenèse hippocampiques [Boldrini et al., 2012], mais cette dernière semble même nécessaire à l'activité anti-dépressive de l'imipramine et de la fluoxétine, des anti-dépresseurs classiques [Santarelli et al., 2003]. L'importance de l'hippocampe dans la lutte contre la dépression pourrait passer par son action inhibitrice sur l'axe Hypothalamus-Pituitaire-Adrénal (HPA). L'activité physique (modélisée chez la souris par la course volontaire dans une roue) augmente la neurogenèse hippocampique et diminue le phénotype dépressif [Yau et al., 2011]. Le stress semble donc être délétère pour la neurogenèse adulte, et réciproquement la neurogenèse adulte paraît être importante pour combattre le stress.

Cependant, des données contradictoires apparaissent dans la littérature. Par exemple, certains effets comportementaux de la fluoxétine sont indépendants de la neurogenèse du gyrus dentelé [David et al., 2009], et l'ablation de la neurogenèse ne provoque pas toujours une dépression [Hanson et al., 2011]. Ces différences pourraient être dues à la complexité et la variabilité dans le temps des facteurs qui régulent la neurogenèse adulte [Eisch and Petrik, 2012].

Comme nous l'avons vu (Paragraphe I.A.5.a.iii), le stress chronique active la microglie [Frank et al., 2014] et les comportements associés sont liés à cette activation [Wohleb et al., 2014]. Par ailleurs, le stress augmente la synthèse de glucocorticoïdes chez la souris [Lehmann et al., 2013] ainsi que dans l'espèce humaine où 80 % des patients souffrant de dépression sévère ont un taux plasmatique de cortisol anormalement élevé [Anacker et al., 2011]. Expérimentalement, l'exposition chronique à des glucocorticoïdes active la microglie dans l'hippocampe [Frank et al., 2014]. En outre, de plus en plus de données montrent l'importance de processus immunitaires, et en particulier de l'inflammation dans la physiopathologie des troubles des l'humeur [Najjar et al., 2013; Noto et al., 2014; Rosenblat et al., 2014; Walker et al., 2014]. La signalisation par les cytokines neuroactives, notamment IL-1β, IL-6 et TNF-α, est modifiée [Bhattacharya et al., 2016]. Un traitement anti-dépresseur efficace diminue ces cytokines, tandis que

chez les patients qui ne répondent pas au traitement le taux de celles-ci reste élevé [Cattaneo et al., 2013; Hannestad et al., 2011; Yoshimura et al., 2009]. L'administration d'interféron-γ dans le traitement de l'hépatite C conduit à des symptômes de dépression et/ou de manie sévère dans 30 à 40 % des patients [Hoyo-Becerra et al., 2014], ce qui suggère un lien de causalité entre interféron-γ et dépression [Baraldi et al., 2012]. Un des mécanismes par lequel l'inflammation conduit à la dépression pourrait être l'induction de l'enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase, qui dégrade la sérotonine, dans la microglie en réponse à des facteurs pro-inflammatoires (IL-2, TNF-α, interféron-γ...) [Müller and Schwarz, 2007]. Il semble donc que des processus inflammatoires soient également importants dans la réponse au stress. Selon une étude récente [McKim et al., 2016], l'inflammation serait même prévalente sur la neurogenèse adulte hippocampique dans les symptômes cognitifs (déficits mémoriels) liés au stress, tandis que les symptômes émotionnels seraient liés à la neurogenèse [Pfau and Russo, 2016].

Il existe une interaction complexe entre inflammation, états mentaux et neurogenèse adulte hippocampique. Cependant, très peu d'études se sont intéressées à la neurogenèse bulbaire dans les troubles de l'humeur. Pourtant, il existe un lien entre olfaction et dépression : beaucoup de patients dépressifs ont des pertes olfactives [Kohli et al., 2016; Negoias et al., 2010; Pause et al., 2001], et la privation olfactive est parfois utilisée comme modèle d'induction de la dépression chez le rongeur [Leonard, 1984]. Nous avons mené des recherches sur un modèle de dépression induite pharmacologiquement chez la souris, afin de préciser le rôle de l'olfaction et de la neurogenèse adulte bulbaire dans la dépression [Siopi et al., 2016]. Cette étude est présentée en détails dans la partie II.B.

I.C.6.e Influence des maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives sont caractérisées par une mort neuronale progressive et inéluctable. Les principales sont les maladies de Parkinson et d'Alzheimer, qui ont pour point commun une accumulation neurotoxique intra ou extracellulaire de protéine (α-synucléine dans la maladie de Parkinson, peptide Aβ et protéine τ dans la maladie d'Alzheimer).

Parmi les signes pré-cliniques communs à ces maladies neurodégénératives se trouvent la dépression, l'anxiété, les troubles cognitifs et olfactifs : des symptômes liés au fonctionnement de l'hippocampe et du bulbe olfactif [Hinnell et al., 2012; Simuni and Sethi, 2008]. Dans la maladie de Parkinson en particulier, de récentes études ont montré des dysfonctionnements dans le bulbe olfactif et l'hippocampe très tôt dans la maladie, bien avant les premiers signes moteurs caractéristiques [Braak et al., 2003; Carlesimo et al., 2012; Weintraub et al., 2011]. Nous nous concentrerons ici sur les liens entre neurogenèse adulte et maladie de Parkinson.

Un des modèles génétiques de maladie de Parkinson, la surexpression de l'α-synucléine humaine chez la souris, provoque une diminution de la neurogenèse adulte hippocampique et bulbaire due à l'augmentation de la mort des neuroblastes, sans toucher à la prolifération cellulaire [Winner et al., 2004]. Cependant selon le modèle génétique employé, les effets sur les néo-neurones varient (modification de la prolifération, de la densité d'épines, de l'arbre dendritique...) [Winner and Winkler, 2015]. Par ailleurs, aucun des modèles génétiques chez la souris n'est accompagné de la dégénérescence de la substance noire et des troubles moteurs associés. D'autres modèles animaux sont fondés sur l'utilisation de substances qui provoquent la mort des neurones dopaminergiques, par exemple le 6-OHDA. Dans ce modèle encore, les résultats sont assez variés. Une étude a par exemple montré une augmentation de la prolifération dans la zone sous-ventriculaire ipsilatérale à la lésion dans la substance noire [Aponso et al., 2008], tandis qu'une autre équipe n'a pas trouvé de différence de neurogenèse en imagerie par bioluminescence [Fricke et al., 2016]. Certaines études sur des cerveaux humains post-mortem ont trouvé une diminution des marqueurs moléculaires de prolifération cellulaire dans la zone sous-ventriculaire [Höglinger et al., 2004; O'Keeffe et al., 2009], tandis que d'autres ne voient pas de différence par rapport aux contrôles [Berge et al., 2011]. Bien qu'il semble exister un effet de la maladie de Parkinson sur la neurogenèse adulte, il n'y a donc pour l'instant pas de consensus sur la nature et le sens de cet effet.

Selon l'hypothèse de Braak [Braak et al., 2003], la progression de la maladie peut être divisée en plusieurs étapes suivant la progression de l'α-synucléine pathologique au niveau périphérique puis dans le système nerveux central, les dernières étapes donnant lieu aux symptômes moteurs. Ainsi, le bulbe olfactif, où la dégénerescence de neurones dopaminergiques et la présence d'α-synucléine pathologique est très précoce, pourrait être une voie d'entrée de la maladie [Del Tredici and Braak, 2016]. L'injection de 6-OHDA dans le bulbe olfactif de souris conduit à la dégénerescence des cellules périglomérulaires dopaminergiques et, de manière intéressante, dans ce modèle la neurogenèse adulte bulbaire est capable de restaurer les neurones dopaminergiques perdus [Lazarini et al., 2014]. Ces données prometteuses nous amènent à considérer la neurogenèse adulte comme moyen de lutte contre la maladie de Parkinson, une possibilité qui est soulignée par un certain nombre d'études [Cave et al., 2014].

Dans le cas des maladies neurodégénératives comme dans le cas des troubles de l'humeur (voir I.C.6.d), l'activation microgliale liée à une inflammation d'une part (voir I.A.5.a.iii), et la neurogenèse adulte d'autre part, semblent jouer un rôle clef. Une meilleure compréhension de l'interaction entre microglie et neurogenèse adulte pourrait ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques.

I.C.7 Neurogenèse adulte chez l'être humain

La présence de neurogenèse adulte chez l'humain a fait longtemps l'objet de débats, par manque de preuves directes. En effet, dans les modèles animaux, la présence de neurogenèse adulte a été démontrée en utilisant des traceurs de prolifération, tels que la thymidyne tritiée dans les études les plus anciennes [Altman and Das, 1965], ou le BrDU. Bien sûr, comme il n'est pas possible d'utiliser de telles méthodes pour évaluer la prolifération cellulaire chez l'humain sain, d'autres moyens ont été mis en œuvre pour étudier la neurogenèse adulte humaine.

Une première étude sur un petit nombre de patients atteints de cancer ayant reçu une injection de BrDU pour marquer les cellules cancéreuses a montré que des neurones sont générés dans l'hippocampe chez l'adulte [Eriksson et al., 1998]. D'autres études ont cherché des marqueurs moléculaires de neuroblastes (Dcx et PSA-NCAM) dans des cerveaux post-mortem. Des neuroblastes putatifs ont été retrouvés dans le gyrus dentelé et la zone sous-ventriculaire [Sanai et al., 2011; Wang et al., 2011]. Ces données montrent la présence de neuroblastes mais ne donnent pas d'informations sur leur survie, leur différenciation en neurones matures et leur intégration dans le circuit [Bergmann et al., 2015].

La démonstration formelle de la présence de neurogenèse adulte chez l'être humain a été apporté par Spalding et al. [2013], grâce à la datation au ^{14}C. En effet, du ^{14}C à la concentration atmosphérique est intégré au moment de la mitose. Dans une cellule post-mitotique comme un neurone, le taux de ^{14}C correspond à celui du moment de sa génération. Chez les adultes nés avant 1955 (début du fort accroisseent du taux de ^{14}C atmosphérique), le taux de ^{14}C dans l'hippocampe est supérieur au taux de l'atmophère au moment de leur naissance, ce qui indique que certains de leurs neurones hippocampiques ont été formés après 1955. Selon les estimations, 700 nouveaux neurones seraient générés chaque jour dans l'hippocampe [Spalding et al., 2013]. Ainsi, la neurogenèse adulte a bien lieu chez l'humain, et des néo-neurones intègrent le réseau de l'hippocampe.

En ce qui concerne la zone sous-ventriculaire, des neuroblastes y sont bien générés, mais ils n'arrivent dans le bulbe olfactif par le courant de migration rostral que chez le nouveau-né [Sanai et al., 2011]. Après l'âge de 6 à 8 mois, très peu de neuroblastes en migration peuvent être observés dans le bulbe olfactif [Sanai et al., 2011]. De plus, le taux de ^{14}C des neurones du bulbe olfactif est similaire à celui de la naissance de l'individu, de sorte que des modèles mathématiques ont estimé au maximum à 1 % le taux de remplacement des neurones du bulbe olfactif en 100 ans [Bergmann et al., 2012]. L'intégration de néo-neurones dans le bulbe olfactif humain est donc minimale, sinon inexistante.

En revanche, [Ernst et al., 2014] ont montré que des néo-neurones intègrent le striatum, qui se situe juste à côté de la zone sous-ventriculaire, ce qui mène à l'hypothèse que les neuroblastes qui naissent dans la zone sous-ventriculaire migrent vers le striatum plutôt que vers le bulbe olfactif. Cependant, chez le rongeur, des astrocytes du striatum peuvent générer des néo-neurones suite à une ischémie [Magnusson et al., 2014]. Des progéniteurs ont été trouvés dans le striatum chez la souris [Inta et al., 2008] , le rat [Dayer et al., 2005], le lapin [Luzzati et al., 2006] et le singe [Bédard et al., 2002; Tonchev et al., 2005], mais leur production semble moins importante que chez l'humain. La fonction de cette neurogenèse adulte n'est pas encore déterminée, mais le rôle cognitif (et non seulement moteur) du striatum est de plus en plus soupçonné : la neurogenèse adulte pourrait participer à la flexibilité cognitive, qui est particulièrement importante chez l'humain [Ernst and Frisén, 2015].

I.D Problématique

Le rôle de la microglie dans le développement des néo-neurones à l'âge adulte n'a été étudié que sur la neurogenèse hippocampique (voir Paragraphe I.C.6.c). Le sujet de cette thèse porte sur l'influence de la microglie sur la neurogenèse adulte dans le bulbe olfactif de la souris. Nous avons fait varier le niveau d'activation de la microglie (voir Paragraphe I.E.1), et évalué les conséquences sur les néo-neurones et les interneurones pré-existants (voir Paragraphe I.E.3).

Comme les facteurs du complément, et en particulier le C3, semblent impliqués dans l'élagage synaptique durant le développement des neurones du tractus optique (voir Paragraphe I.A.6.c), dans une deuxième partie de ce travail nous avons comparé la neurogenèse adulte chez les souris $C3^{-/-}$ et les souris immunocompétentes de même fond génétique (voir Paragraphe I.E.1.d)

I.E Modèles et méthodes utilisés

Sauf mention contraire, toutes les expériences ont été réalisées sur des souris C57/BL6 (B6) âgées de 8 à 10 semaines, que nous appellerons souris « sauvages » (ou WT).

I.E.1 Inflammation et modulation de l'activité bulbaire

I.E.1.a Déafférentation olfactive

Le dichlobénil est une toxine qui détruit les glandes de Bowman de l'épithélium olfactif [Brandt et al., 1990]. La toxicité passe par la protéine mitochondriale cytochrome P450 dans les glandes de Bowman, suivie par une forte inflammation, la nécrose et le détachement de l'épithélium olfactif [Bergman et al., 2002; Mancuso et al., 1997; Xie

et al., 2013]. Par conséquent, les neurones récepteurs olfactifs meurent, et le nerf olfactif dégénère : c'est ce qu'on appelle la déafférentation du bulbe olfactif (Figure I.17A).

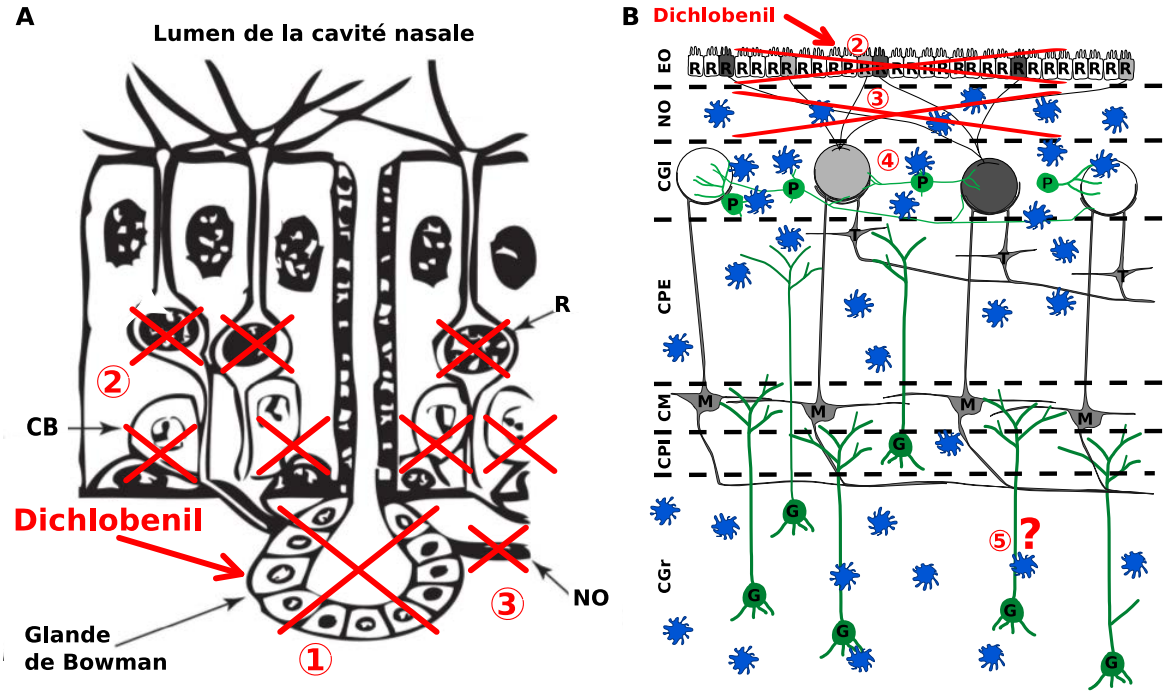


FIGURE I.17 – Effets du dichlobénil sur l'épithélium olfactif (A) et sur le bulbe olfactif (B). Le dichlobénil provoque la nécrose des glandes de Bowman (1). S'ensuit une désorganisation de l'épithélium olfactif et la mort des cellules basales (**B**) et des neurones récepteurs olfactifs (**R**) (2) dont les axones, qui forment le nerf olfactif (**NO**) dégénèrent (3). La microglie s'active et prolifère alors dans le bulbe olfactif (4). Nous étudions l'impact de cette déafférentation à l'âge adulte sur les néo-neurones et les interneurones pré-existants (5). **M** : cellule mitrale ; **T** : cellules en touffe **G** : cellule granulaire ; **P** : cellule périglomérulaire ; **CGr** : couche des grains ; **CPI** : couche plexiforme interne ; **CM** : couche mitrale ; **CPE** : couche plexiforme externe ; **CGl** : couche glomérulaire ; **NO** : nerf olfactif ; **EO** : épithélium olfactif. Figure (A) adaptée de Mackay-Sim [2010].

La déafférentation du bulbe olfactif entraine la perte de l'olfaction couplée à une forte activation de la microglie (Figure I.17B), qui atteint son maximum à 3 jours post-injection intra-péritonéale [Lazarini et al., 2012]. Dans une étude précédente du laboratoire, il a été montré que le dichlobénil diminue la survie des néo-neurones du bulbe olfactif, et que cet effet est probablement dû à l'inflammation consécutive à la déafférentation car un traitement anti-inflammatoire suffit à restaurer la survie des néo-neurones [Lazarini et al., 2012].

Dans les travaux présentés ici, nous explorons l'influence de l'inflammation induite par le dichlobénil sur le développement (dendritique et synaptique) des néo-neurones du bulbe olfactif.

I.E.1.b LPS

Le LPS est très couramment utilisé comme modèle d'inflammation . Ici, nous avons utilisé la voie intra-nasale pour inoculer le LPS. Il a été montré que des agents in-

fectieux inoculés par cette voie peuvent agir sur le bulbe olfactif *via* des cytokines, voire pénétrer dans le bulbe olfactif [Herbert et al., 2012]. Des nanoparticules cristallines peuvent également être transportées de l'épithélium olfactif jusqu'au bulbe olfactif [Hopkins et al., 2014]. Nous avons donc utilisé la voie intranasale comme voie d'entrée physiologique et non invasive dans le bulbe olfactif.

Pour valider l'entrée du LPS dans le bulbe olfactif suite à une inoculation intranasale, nous avons utilisé du LPS couplé à un fluorophore (lipopolysaccharides de *Salmonella enterica* sérotype Minnesota, conjugué à un Alexa Fluor488), et nous avons cherché l'apparition de fluorescence dans le bulbe olfactif à plusieurs temps post-injection (10 minutes, 1 h, 3 h, 16 h, 3 jours). Nous n'avons pas pu détecter de fluorescence dans le bulbe olfactif quelque soit le temps post-injection, alors que nous avons retrouvé de la fluorescence dans l'épithélium olfactif et les poumons dès 10 minutes post-inoculation (Figure I.18).

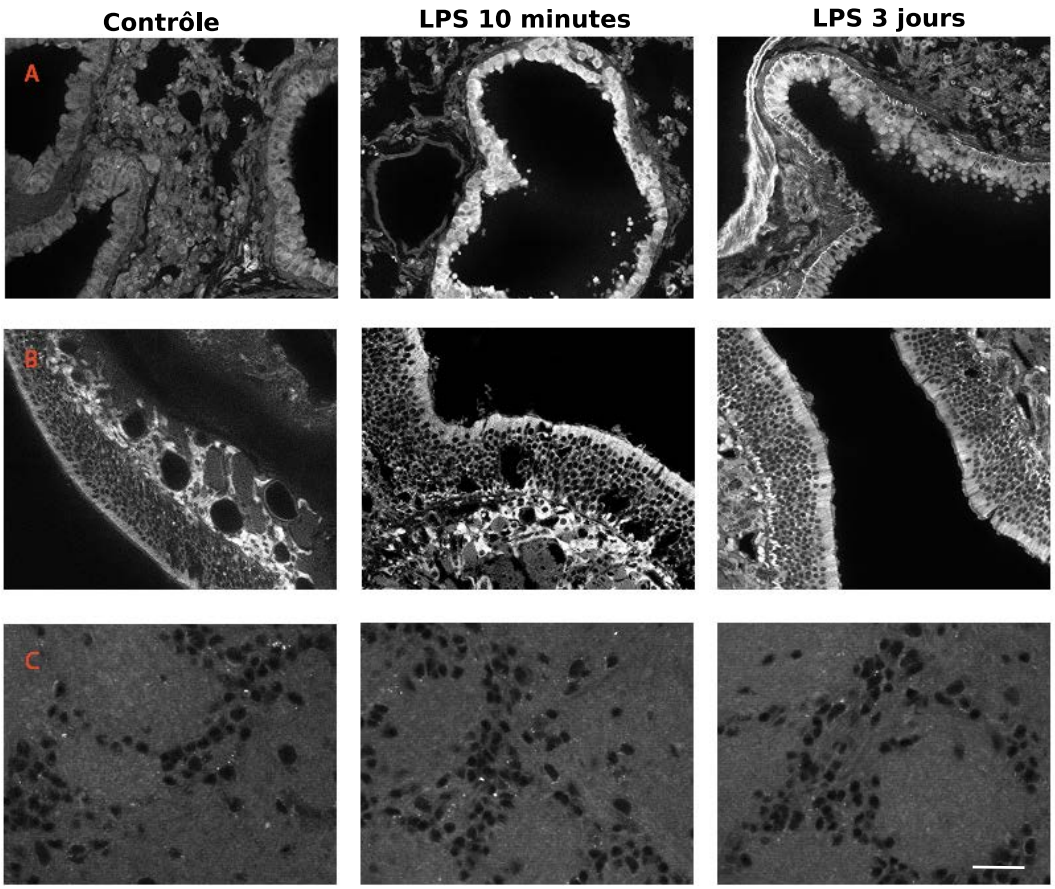


FIGURE I.18 – Diffusion du LPS inoculé intra-nasalement.
Images en microscopie confocale de la fluorescence du LPS de *Salmonella enterica* sérotype Minnesota conjugué à un fluorophore Alexa Fluor488 dans le poumon (A), l'épithélium olfactif (B) et la couche glomérulaire du bulbe olfactif (C). Malgré une forte auto-fluorescence des tissus, on peut voir une augmentation de la fluorescence dès 10 minutes dans les trachées du poumon et l'épithélium olfactif mais pas dans le bulbe olfactif. Barre d'échelle : 20 μm.

L'augmentation du signal fluorescent par immunohistochimie utilisant un anticorps secondaire biotinylé donne le même résultat. Nous ne pouvons donc pas confirmer

l'entrée dans le bulbe olfactif du LPS inoculé intra-nasalement : nous ne le détectons pas, soit parce qu'il n'a pas pénétré le bulbe olfactif, soit parce qu'il est en concentration inférieure au seuil de détection dont nous disposons.

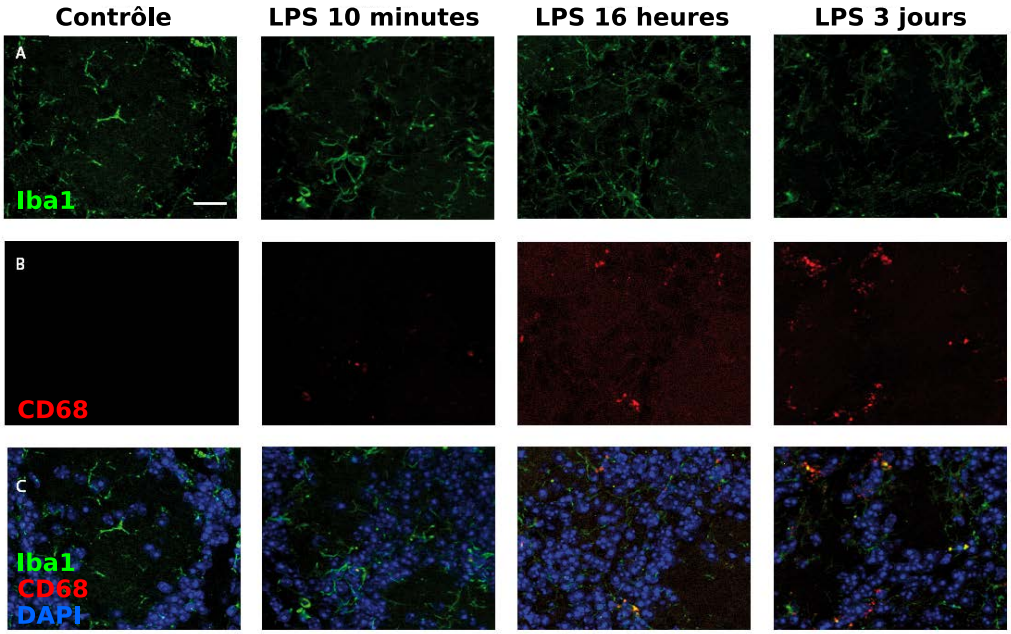


FIGURE I.19 – Activation microgliale dans la couche glomérulaire du bulbe olfactif suite à l'inoculation de LPS.
Images en microscopie confocale à différents temps après l'inoculation de LPS. (A), marquage immuno-fluorescents de cellules de microglie marquées par Iba-1 ; (B), marquage immuno-fluorescents du marqueur d'activation CD68 ; (C), somme des deux marquages, ainsi que du marqueur nucléaire DAPI (qui permet de voir les glomérules). L'activation de la microglie commence entre 10 minutes et 16 heures après l'inoculation intranasale de LPS, et est toujours présente 3 jours après l'inoculation. Contrôle : inoculation intra-nasale de saline. Barre d'échelle : 15 μm

En revanche, nous avons détecté une activation microgliale dans le bulbe olfactif consécutive à l'administration de LPS et absente lors de l'administration de véhicule (saline) (Figure I.19 et Figure 1 de l'article 1, partie II.A.3). Dans la suite de l'étude, nous avons utilisé le LPS de *Salmonella enterica* sérotype *typhimurium* tout au long de nos expériences.

I.E.1.c Anti-inflammatoire

La minocycline est un antibiotique à large spectre, et est également couramment utilisée pour ses propriétés anti-inflammatoires, particulièrement dans le système nerveux central [Garrido-Mesa et al., 2013]. Nous l'avons utilisée en injections répétées aux doses décroissantes, comme préalablement décrit par Ekdahl et al. [2003].

I.E.1.d Souris C3$^{-/-}$

Pour évaluer l'implication du complément dans la neurogenèse adulte bulbaire, nous avons utilisé une lignée de souris déficientes en C3 fournie par les laboratoires Jackson

(USA) : $C3^{tm1Crr}$, que nous noterons dorénavant $C3^{-/-}$. Nous avons maintenu cette lignés à l'état homozygote.

Ces souris $C3^{-/-}$ ont un fond génétique B6, qui correspond à la lignée sauvage utilisée pour toutes les expériences présentées dans la suite.

I.E.2 Marqueurs de la microglie

Pour révéler la microglie, nous avons utilisé le marquage immunohistochimique de la protéine Iba-1, et dans certaines expériences (non montrées ici), nous avons utilisé les souris $CX3CR1^{+/-}$, où l'un des gènes codant pour le récepteur à la fractalkine est remplacé par le gène de la protéine fluorescente GFP.

Nous avons utilisé l'expression du CD68 (révélé par immunohistochimie) comme marqueur de l'activation microgliale.

I.E.3 Effets sur les néo-neurones

I.E.3.a Marquage des néo-neurones du bulbe olfactif

Pour marquer spécifiquement les néo-neurones du bulbe olfactif, nous avons utilisé des injections de lentivecteurs exprimant des protéines fluorescentes (GFP ou TdTomato) dans le courant de migration rostral (voir partie *methods* de l'Article 1, Paragraphe II.A.3).

I.E.3.b Morphologie des néo-neurones

Pour évaluer la morphologie des cellules granulaires, la fluorescence des néo-neurones marqués par un lentivirus est augmentée par immunohistochimie pour faire apparaître les dendrites les plus fines et les épines. La forme des neurones entiers est tracée avec le logiciel Imaris (Bitplane) à partir d'images prises au microscope confocal. Pour l'évaluation des épines, des portions du dendrite apical (Figure I.16) et leurs épines sont tracées à l'aide du logiciel Imaris.

I.E.4 Tests comportementaux

Nous avons réalisé des tests de comportement chez la souris pour évaluer l'impact des différents traitements que nous avons effectués sur divers paramètres tels que l'olfaction, l'activité ou encore le niveau d'anxiété des animaux. Nous exposerons ici le principe de ces tests, sans entrer dans tous les détails pratiques.

I.E.4.a Olfaction

I.E.4.a.i Test de la Nourriture Cachée

Le principe de ce test est qu'une souris affamée ayant perdu l'odorat est incapable de trouver rapidement de la nourriture enterrée sous la litière, alors qu'une souris normale la trouvera en moins d'une minute. Pour cela, les souris sont affamées pendant 20h avant le test, et ont préalablement goûté les céréales Coco Pops (Kellog's) utilisés pour le test.

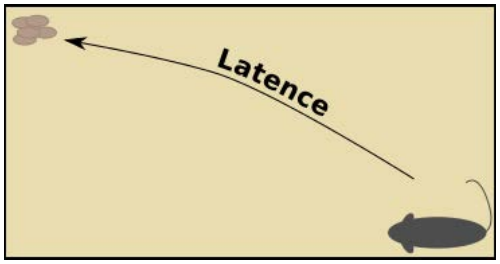


FIGURE I.20 – Principe du test de la Nourriture Cachée.
On mesure la latence de la souris affamée à trouver des céréales enterrées sous la litière dans le coin opposé de la cage.

On mesure le temps mis par la souris pour trouver les céréales cachées sous la litière dans le coin opposé à celui où la souris est déposée dans la cage (à laquelle elle a été préalablement habituée pendant 15 minutes) (Figure I.20). L'opération est renouvelée plus tard, mais avec cette fois les céréales visibles, dans un coin différent du premier test. Pour plus de détails, vous pouvez consulter [Khodosevich et al., 2013]

I.E.4.a.ii Test d'habituation - déshabituation olfactive

FIGURE I.21 – Test d'habituation - déhabituation olfactive.
Photo d'une souris explorant une odeur présentée sur un papier filtre positionné sous le plancher de la cage test.

Le principe de ce test est qu'une souris explore moins longtemps une odeur qu'elle (re)connaît qu'une odeur nouvelle (Figure I.21). On présente à une souris plusieurs fois la même odeur (présentations de 2 minutes espacées de 2 minutes), et on chronomètre son temps d'exploration de l'odeur. Ce temps d'exploration diminue d'une présentation à l'autre (reconnaissance de l'odeur). On présente alors une odeur différente, et le temps

d'exploration pour cette nouvelle odeur est plus élevé (la souris ne reconnaît pas cette odeur et s'y intéresse) [Tepavčević et al., 2011].

I.E.4.b Anxiété / dépression

Tous ces test ont été décrits en détail dans Siopi et al. [2016] (II.B).

I.E.4.b.i *Open Field*

La souris est placée dans une large enceinte carrée fortement éclairée. On mesure sur vidéo sa vitesse de déplacement et la distance parcourue (ce qui donne des informations sur sa locomotion), ainsi que sa position : une souris anxieuse restera près des bords, et ira moins au centre de la surface. Il s'agit donc d'un test d'activité motrice et d'anxiété.

I.E.4.b.ii *Novelty Suppressed Feeding*

On introduit une souris affamée dans une cage inconnue et fortement éclairée, avec en son centre une croquette de nourriture. La souris est face à un dilemme entre sa faim et sa peur du centre éclairé. Une longue latence avant de manger indique un phénotype anxieux.

I.E.4.b.iii *Splash Test*

On pulvérise une solution de sucrose sur le dos de la souris, et on chronomètre la latence avant qu'elle ne se nettoie le dos, ainsi que le nombre de fois qu'elle le toilette et le temps total de léchage sur 6 minutes. Une longue latence et un faible toilettage sont un signe d'anhédonie, que l'on assimile à un phénotype dépressif.

I.E.4.c Locomotion : Rotarod

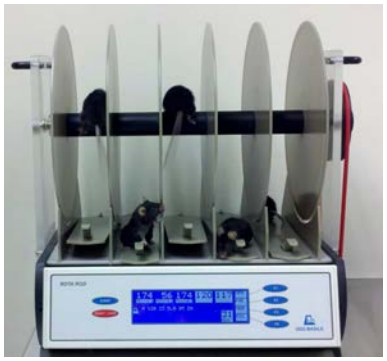


FIGURE I.22 – Test du Rotarod.
On mesure la latence de la souris à tomber du cylindre en roation.

La souris est placée sur un cylindre en rotation dont la vitesse accélère petit à petit. On mesure la latence de la souris à tomber du cylindre. Ce test mesure la coordination des mouvements (moins la coordination est bonne, plus la souris tombe vite) et, si

l'exercice est répété plusieurs jours de suite, l'apprentissage moteur [Lazarini et al., 2014].

I.E.4.d Mémoire de travail : reconnaissance d'objet

FIGURE I.23 – Test de reconnaissance d'objet.
Photo prise durant la deuxième présentation d'objets. (A), prise électrique, objet déjà présenté à la première session. (B) boulon en cuivre, objet nouveau.

La souris est placée dans une cage comprenant 3 compartiments dans la largeur, reliés par des portes. On place un objet dans chacun des compartiments extérieurs, et on mesure le temps d'exploration de chaque objet. On change l'un des objet, et on mesure à nouveau le temps d'exploration. Si la souris se souvient de l'objet présenté à la première session, elle explore beaucoup plus le nouvel objet lors de la deuxième session. Ce test est supposé dépendre principalement de la mémoire hippocampique.

II Résultats

II.A Premier article : Denizet et al., *Sensory deprivation increases phagocytosis of adult-born neurons by activated microglia in the olfactory bulb*

II.A.1 Contexte

Il a été montré que la microglie joue un rôle important dans le développement embryonnaire (voir paragraphe I.A.5.b.i) [Frost and Schafer, 2016] et dans la neurogenèse adulte hippocampique (voir paragraphe I.A.5.b.ii) [Chesnokova et al., 2016]. Cependant, peu de travaux ont exploré l'impact de la microglie sur le développement des néo-neurones bulbaires.

Une étude précedente du laboratoire [Lazarini et al., 2012] a montré que la déafférentation du bulbe olfactif par le dichlobénil provoque une forte diminution de la survie des néo-neurones bulbaires. Cet effet est restauré par la minocycline, qui inhibe l'activation microgliale, ce qui suggère que la microglie activée serait responsable de la suppression des néo-neurones.

Dans cette étude, nous avons voulu prolonger ce travail en étudiant l'élagage des néo-neurones bulbaires (cellules granulaires) par la microglie, selon son degré d'activation.

II.A.2 Résumé

Le bulbe olfactif est une structure fortement plastique, notamment chez les rongeurs où la neurogenèse adulte apporte constamment de nouveaux interneurones qui s'intègrent dans le circuit [Lledo et al., 2006]. Ces néo-neurones ont des propriétés

uniques, et participent au traitement des données olfactives, à l'apprentissage et à la mémoire [Alonso et al., 2012; Lazarini et al., 2009; Lepousez et al., 2014; Sakamoto et al., 2014; Valley et al., 2013].

La microglie est impliquée dans l'élagage des neurones durant la neurogenèse embryonnaire [Frost and Schafer, 2016]. Cette fonction de la microglie pourrait se retrouver dans la neurogenèse adulte bulbaire.

Pour explorer cette hypothèse, nous avons combiné d'une part des injections stéréotaxiques de lentivecteurs exprimant une protéine fluorescente chez la souris âgée de 6 jours (P6d) ou 8 semaines (P8w) pour marquer spécifiquement les neurones néonataux ou les néo-neurones respectivement ; d'autre part plusieurs traitements pour moduler l'activité de la microglie : déafférentation par le dichlobénil, inflammation par inoculation intranasale de LPS et traitement anti-inflammatoire par la minocycline (voir paragraphe I.E.1).

Comme montré précédemment [Lazarini et al., 2014], nous avons confirmé que le dichlobénil provoque la déafférentation du bulbe olfactif (Figure 1C) [1] accompagnée d'une perte olfactive (Figure 1D) et d'une activation microgliale (Figure 1B). Le LPS intranasal, en revanche, occasionne l'activation de la microglie (Figure 1B) sans que l'olfaction ne soit affectée (Figures 1C, D).

Nous avons réalisé des marquages immunohistochimiques et employé des méthodes de microscopie confocale pour mettre en évidence et analyser la phagocytose des néo-neurones par la microglie (Figure 1H) ainsi que la densité synaptique des cellules granulaires (Figure 2).

Selon nos données, la microglie engouffre plus de morceaux de néo-neurones que de neurones néonataux (Figures Ha-c), et suite à la déafférentation par le dichlobénil elle phagocyte préférentiellement les neurones nés à l'âge adulte (Figures Ha-b). Par ailleurs, la déafférentation induit une diminution de la densité d'épines des cellules granulaires seulement lorsqu'elle a lieu peu de temps après la naissance de la cellules (Figures 2B-C). La densité d'épines des cellules granulaires néonatales est, quand à elle, insensible au dichlobénil et au LPS (Figure 2Db). La minocycline ne restaure pas les effets du dichlobénil (Figure 2B), ce qui laisse penser que l'effet du dichlobénil est dû au manque de stimulation plutôt qu'à l'inflammation. Par ailleurs, l'activation microgliale par le LPS n'induit pas de variation de la densité d'épines (Figures 2Cc et 2Dc).

Breton-Provencher et al. [2014] ont montré que les épines des cellules granulaires de 7 jours (mais pas de 14 jours) sont très dynamiques en réponse à l'activité des

1. Toutes les références à des figures faites dans ce résumé renvoient aux figures de l'article paragraphe suivant (II.A.3).

cellules mitrales (et donc aux afférences olfactives), ce qui pourrait expliquer l'effet de la déafférentation sur la densité synaptique spécifiquement sur les jeunes néo-neurones.

Dans cette étude, nous montrons que la microglie interagit et engouffre principalement des néo-neurones dans le bulbe olfactif de la souris adulte, de manière similaire à ce qui a été observé dans l'hippocampe [Sierra et al., 2014]. De plus, l'action de la microglie est dépendante de l'activité : la déafférentation renforce la phagocytose différentielle des néo-neurones. La microglie a été impliquée dans l'élagage synaptique dans plusieurs contextes [Wu et al., 2015], mais l'activation microgliale ne provoque pas de variation de la densité des épines dans notre modèle. Cela pourrait être dû à l'hétérogénéité de la microglie dans l'espace et le temps (voir paragraphe I.A.4) [Carson et al., 2006; Grabert et al., 2016; Lawson et al., 1990].

II.A.3 Article

Article tel que soumis dans le journal *Brain, Behavior and Immunity* le 1er juin 2016.

*Manuscript
Click here to view linked References

Brain, Behavior, and Immunity
Short Communication

Sensory deprivation increases phagocytosis of adult-born neurons by activated microglia in the olfactory bulb

Marie Denizet[a,b], Laurent Cotter[a,b], Pierre-Marie Lledo[a,b] and Françoise Lazarini[a,b]

[a] Institut Pasteur, Unité Perception et Mémoire, 75015 Paris, France.

[b] Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 3571, 75015 Paris, France.

Correspondence: Dr.Pierre-Marie Lledo or Dr. Françoise Lazarini, Perception and memory laboratory, Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75015 Paris, France, pmlledo@pasteur.fr or lazarini@pasteur.fr

E-mail address: Marie Denizet, marie.denizet@pasteur.fr
Laurent Cotter, laurent.cotter@pasteur.fr
Pierre-Marie Lledo, pmlledo@pasteur.fr
Françoise Lazarini, lazarini@pasteur.fr

Figures: 2 Tables: 0 Pages: **16**

Words in the Abstract: **149** Total: **3440**

Key words: Adult neurogenesis, hyposmia, neuroinflammation, LPS, spines

Abstract

The olfactory bulb (OB) is a highly plastic structure that can change organizational networks depending on environmental inputs in adult mammals. Particularly, in rodents, adult neurogenesis underlies plastic changes in the adult OB circuitry by continuously adding new interneurons to the network. We addressed the question of whether microglia, the immune cells of the brain, were involved in pruning OB neurons. Using lentiviral labeling of neurons in neonatal or adult mice and confocal analysis, we showed that microglia engulfed parts of neonatal-born and adult-born neurons in the healthy OB. We demonstrated that OB deafferentation increased phagocytosis of adult-born, but not neonatal-born neurons, by activated microglia. Conversely, intranasal lippopolysaccharide administration induced activation of microglia but changed neither adult neurogenesis nor olfaction in mice. Our data reveal that steady-state microglia eliminate adult-born neurons and their synapses in both healthy and sensory deprived OBs, thereby adapting neuronal connexions to the sensory experience.

1. Introduction

The olfactory bulb (OB) is a highly plastic structure that modifies organizational networks depending on the degree of environmental inputs in adult mammals. Particularly, the olfactory system is characterized by a unique turnover of granule cell (GC) interneurons, a feature called adult neurogenesis, which significantly contributes to the functional plasticity of the system (Lledo et al., 2006; Imayoshi et al., 2008). Every day, thousands of new GCs are added in the adult mammalian OB circuit; however, only 50 % of them survive for longer than a month after their birth, as many undergo apoptosis (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002; Mouret et al., 2008). Neuronal activity instructs the survival or death of young GCs (Yamaguchi and Mori, 2005; Lazarini and Lledo, 2011) but the mechanisms involved in the permanent sculpting of neuronal connections in the OB are only beginning to be deciphered.

Microglia are the immune resident cells of the brain and play a major role in innate immunity in the Central Nervous System (CNS) (Nimmerjahn et al., 2005; Hughes, 2012). Increasing evidence supports that, aside their phagocytic activity, microglia promote developmental neuronal apoptosis and synaptic pruning in several brain regions, in both healthy and pathological CNS (Marín-Teva et al., 2004; Schafer et al., 2012; Ueno et al., 2013). Recent evidence suggests that microglia regulate several steps of adult neurogenesis in the olfactory system and hippocampus (Chesnokova et al., 2016). Microglia play a central role in eliminating adult-born neurons in healthy and inflamed brain (Sierra et al., 2010; Paolicelli et al., 2011).

We have previously demonstrated that suppression of microglial activation restored adult neurogenesis in the deafferented OB (Lazarini et al., 2012). Here we focus on the interactions between microglia and GCs and found that microglia engulfed adult-born but not neonatal GCs in the OB after sensory deafferentation.

2. Methods

2.1. *Animals and treatments*

Experiments were performed using male C57BL/6JRj mice (Janvier, France), in compliance with the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments. Experimental designs and procedures were approved by the local ethics committee (2013-0081, CETEA 89). Groups consisted of 3-5 animals for histology, 4-12 animals for behavior.

Chemical ablation of olfactory epithelium using Dichlobenil (Dichlo) was achieved as previously described (Lazarini et al., 2012). Vehicle mice were injected with DMSO only.

Anti-inflammatory treatment with Minocycline (Mino) was performed as previously described (Lazarini et al., 2012).

Intranasal injection of lipopolysaccharides (LPS) was administrated to evoke neuroinflammation (Kapetanovic et al., 2010). LPS from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium (Sigma-Aldrich) was dissolved in Limulus Amebocyte Lisate reagent water (Lonza) at the stock concentration of 5 $g.L^{-1}$. LPS was freshly diluted in endotoxin-free saline to the concentration of 1 $g.L^{-1}$ before use and 0.8 $\mu L.g^{-1}$ of this solution were intra-nasally instillated by presenting drops in front of nostrils under anesthesia (60 $mg.kg^{-1}$ ketamine (Merial) and 1.2 $mg.kg^{-1}$ xylazine (Merial)). Vehicle mice received saline only.

2.2. *Behavior*

To assess olfaction we used the Burried Food Finding test after 20 hours of food deprivation (Lazarini et al., 2012). About 10 pieces of "Coco Pops" cereals were hidden in a corner of the test cage under 1.5 cm bedding. The tested mouse was placed in the test cage in the opposite corner and the latency to find the food (defined as the time to locate cereals) was recorded.

Open Field behavior was assessed by placing animals individually in 43x43 cm^2 containers during 30 minutes using a video camera tracking system (Noldus Ethovision 3.0, Siopi et al., 2016).

2.3. *Stereotaxic lentiviral injections*

A replication-deficient lentiviral vector was used to express GFP driven by the Cytomegalovirus promoter (LV-CMV-GFP, 13.8 $ng.L^{-1}$ of viral antigen) or TdTomato driven by the ubiquitin C promoter (LV-UbC-TdTomato, 8.10^{11} $VG.L^{-1}$, constructed using Addgene plasmid # 22771).

Stereotaxic bilateral injections of lentiviral vector (200 nl per site) in adult mice were performed in the Rostral Migratory Stream (RMS) at 3.30 mm anteroposterior, ±0.82 mm mediolateral from Bregma and -2.90 mm dorsoventral from skull as previously described (Siopi et al., 2016).

For injections in neonatal mice, male mouse pups at Postnatal day 6 (P6d) were isoflurane-anesthetized, and positioned in a homemade cast providing isoflurane for anesthesia maintenance. Bilateral stereotaxic injections of lentiviral vectors (350 nl/site) were performed as previously described (Alonso et al., 2012).

2.4. *Immunohistochemistry, confocal imaging and quantification*

Sixty micrometer coronal brain sections were obtained using a vibrating microtome (VT1000S, Leica) or a microtome (SM2010 R, Leica). Immunostaining was performed on free-floating sections as previously described (Lazarini et al., 2012) using anti-IBA1 (1:400; Wako), anti-CD68 (1:2000; Serotec), anti-OMP (1:2000; Wako), anti-GFP (1:1000; Molecular probes), and anti-RFP (1:4000 Rockland) antibodies.

For spine density, eight sections 180 µm apart were selected for each animal, using the accessory OB as landmark. About 10 GCs (located >60 µm in the Granule Cell Layer

(GCL)) in each animal were imaged for each zone (Fig. 2A) using a confocal microscope (Zeiss LSM 700). Spines were manually traced using the Filament tracer module of Imaris software (Bitplane, v7.6.4).

For cell counting, 2-3 slices separated by 180 µm were selected for each animal. Whole-OB mosaics were obtained using the spining disc confocal microscope Cell Voyager (CV1000, Yokogawa). Quantification of $IBA1^+$ cell density was performed using the Icy open source platform (www.icy.bioimageanalysis.org). The borders of the RMS, glomerular layer (GL), Internal Plexiform Layer (IPL), MCL, External Plexiform Layer (EPL), GCL and Olfactory Nerve (ON) were delineated (Fig. 1A). $IBA1^+$ cells were automatically counted using the “Spot detector” tool. Those containing TdTomato inclusions were manually counted.

2.5. *Statistical analysis*

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software. We used 1 or 2 way ANOVA followed by Sidak's or Tukey's post-hoc tests where appropriate. Non-parametric data were analyzed with Log-rank or Kruskal-Wallis' tests where appropriate. Significance level was set at $p<0.05$. Data are presented as mean ± S.E.M.

3. Results

3.1. Dichlo but not LPS induces olfactory deficit

Olfactory sensory neurons situated in the olfactory epithelium project through the ON to glomeruli in the GL where they contact output mitral/tufted cells (Fig. 1A and C). Our initial studies (Lazarini et al., 2012) showed that Dichlo induced olfactory epithelium lesion with sensory neuron degeneration (Fig. 1C), thus OB deafferentation, leading to OB microglial activation (Fig.1B) and olfactory loss (Fig. 1Da). To analyse the consequences of microglial activation *per se*, we used here intranasal LPS, endotoxin from gram-negative bacteria, as a control inflammation. A single systemic LPS administration activates microglia through toll-like receptors, resulting in pro-inflammatory cytokine elevation as well as delayed and progressive neurodegeneration (Liu et al., 2005; Qin et al., 2007). We confirmed that one intranasal LPS inoculation resulted in a transient sickness behavior, evident by a significant decrease in weight at 7 days post-injection (d.p.i.) (% body weight change: Vehicle: 10.05±2.704, LPS: -15.6±5.731; Dichlo:5.113±5.397, $F_{(2,13)}$=9.985, **p=0.002; LPS versus vehicle: t_{13}=4.358, **p=0.0023). Acute injection of LPS activated OB microglia, as indicated by the strong expression of CD68 (marker of activated microglia) at 3 d.p.i. (Fig. 1C). However Dichlo —but not LPS— increased IBA1^{+} cell density in the GL and the ON compared to vehicle (Fig. 1Ga, $F_{treatment(1,14)}$=49.19, ****$p_{treatment}$<0.0001, Sidak's post-hoc test ****$p_{dichlo vs vehicle}$<0.0001 in GL and ON), signifying differential effect of these toxins on the microglial activation state. To test whether LPS administration resulted in alteration of the sensory organ and then olfactory deficits, we first quantified staining for OMP (marker of mature olfactory sensory neurons) in the GL of the OB at 7 d.p.i (Fig. 1C) showing that LPS did not impair olfactory sensory neurons (lower panel), while Dichlo drastically reduced OMP immuno-reactivity. To assess olfaction, we used the buried food finding test at 3 d.p.i. Dichlo-injected mice were very slow to find hidden cereals, and half of them did not even find the food at the issue of the

test (Mantel-Cox log-rank test, χ^2=10.39, **p=0.0013; Fig. 1Da). As they covered the same distance as control mice in open field (Fig. 1Db), their failure in the buried food finding test was probably due to olfactory loss rather than mobility. Conversely, LPS-injected mice did not show any impairment in these two tests, indicating that LPS changed neither locomotion nor olfaction at 3 d.p.i.

3.2. Microglia engulf adult-born neurons in sham and Dichlo-injected mice

To study the interactions between microglia and GCs in the OB, we injected a lentivirus in the RMS either at P8w (Fig. 1Ea) or at P6d (Fig. 1Eb), thus specifically labeling adult-born or neonatal-born GCs. All mice were analysed at P11w, 1 week after LPS or Dichlo treatment (Fig. 1G, H). As shown with confocal microscopy and quantitation (Fig.1F, H) in all groups of mice, more than 5 % of OB microglial cells engulfed neuronal parts, probably for degradation. Figure 1F represents a typical interaction between microglia and an adult-born GC, showing a lateral neuronal process phagocytosed. Furthermore, in the healthy vehicle-treated OB, the percentage of microglia containing adult-born neuronal inclusions was 2 to 3 times higher than neonatal-born neurons (31.39 % versus 7.84 % in GCL, $F_{(12,48)}$=6.316, ****p<0.0001; Fig. 1H). Finally, the number of microglia containing inclusions of adult-born, but not of neonatal-born neurons were significantly higher following deafferentation. Importantly, variation in the number of microglia with neuronal inclusions was not dependent on the cell density of virally-labelled GCs, as the number of labelled neurons and the proportion of phagocytic microglia were not correlated (n=46 slices from all groups of animals, r^2=0.02996). Hence, we showed that following olfactory deafferentation, microglia phagocytosed rather adult-born than neonatal-born neurons.

3.3. Sensory deprivation alters spine density in an age-dependent manner

The enhanced microglial phagocytosis following deafferentation might reflect changes in pruning of dendritic spines of adult-born neurons. To test this hypothesis, we assessed

spine density in two different zones of the GCs (Fig. 2A): the medial zone (at the MCL/EPL transition) and the distal zone (at the end of the dendritic tree in the EPL near the GL).

We first counted the spines of adult-born neurons in mice injected with Dichlo one day after lentiviral injection (Fig. 2Ba). We found that deafferentation reduced spine density compared to vehicle both in the medial (**$p_{dichlo VS vehicle}$=0.0013) and distal (*$p_{dichlo VS vehicle}$=0.0371) zones (Fig. 2B). Three weeks of daily treatment with the anti-inflammatory drug Minocycline, which inhibits microglia (Lazarini et al., 2012), failed to restore spine density. Taken together, these observations suggest that inflammation is not implicated in the spine reduction following deafferentation.

Deafferentation might affect either maturation or pruning of the adult-born neurons as Dichlo administration took place during early neuronal maturation. To adress this, we performed a new experiment where mice were injected with Dichlo 2 weeks after neuronal labelling in order to target more mature neurons (fig 2Ca). In these conditions, Dichlo had no effect on spine density (Fig. 2Cb). As a control inflammation model we used LPS treatment, which also failed to impair spine density (fig 2Cc). Finally, we evaluated the spine density of neonatal-born neurons (fig 2D) which was slightly lower than that of adult-born neurons (for DMSO-treated mice: $F_{(1,113)}$=31.07, ****$p_{adult VS neonatal}$<0.0001). Dichlo (Fig. 2Db) and LPS (Fig. 2Dc) showed no effect on neonatal-born neurons spine density. Altogether, these data revealed that spine density of adult-born neurons were affected by sensory deprivation only when neurons were at a very immature stage. These findings are consistent with previous data showing that activity-driven spine modifications on adult-born GCs occurs solely on young GCs (Breton-Provencher et al., 2014).

4. Discussion

In the present study, we demonstrate that microglia engulf parts of GCs in the healthy adult OB, thus continuously shaping OB networks. These data expand on previous findings showing that microglia participate in shaping CNS networks during development (Paolicelli et al., 2011; Shafer et al., 2012). Adult-born GCs present unique properties required for a proper olfactory processing and memory (Alonso et al.,2012; Valley et al., 2013; Lepousez et al., 2014; Sakamoto et al., 2014). We found that in the adult OB, microglia preferentially engulf adult-born rather than neonatal-born GCs, and deafferentation promotes this effect (Fig. 1H). Our findings are in accordance with those observed in the adult hippocampus, where microglia are shown to participate in the continuous shaping of neuronal circuits, by phagocytosing newborn neuroblasts (Sierra et al., 2010). These data support the role of microglial activity in hippocampal-dependent learning and memory processing (Sierra et al., 2010). We show that microglia are also important in coping with changing environmental demands, shaping the adult OB circuit in response to life experience. Further experiments are required to reveal whether microglia target all adult-born GCs or only the yougest neurons, and how these immune cells recognize the neuronal parts to engulf.

Here we focus on GCs as most OB adult-born neurons are located in the GCL, with a preference for deep GCL (Lledo et al., 2006). Adult neurogenesis also gives rise to new GABA periglomerular cells expressing or not dopamine (Kiyokage et al., 2010), involved in olfactory processing and innate responses to predator odorants (Lazarini et al., 2014). We found here that inflammation following Dichlo administration was most prominent in the GL, with significant microglial proliferation. It would thus be interesting to prolong this study by investigating the impact of microglial activation on the morphology of these periglomerular cells.

We previouly showed that Dichlo drastically reduced the survival of adult-born

neurons (Lazarini et al., 2012). Survival impairments were restored by Mino, suggesting that the effect of Dichlo on neuronal survival was due to inflammation, and not to sensory loss itself. There is growing evidence showing the implication of activated microglia in synaptic pruning (Wu et al., 2015). However, in the present study, the effect of Dichlo on spine density was not reversed by Mino (Fig. 2Bb). Further experiments using *in-vivo* 2-photon microscopy on OB tissue are needed to elucidate the cellular and molecular interactions between adult-born neurons and microglia.

In conclusion, we provide direct evidence that microglia engulf parts of adult-born neurons in an afferentation-dependant way. Furthermore, we reveal that spine density of GCs is resistant to challenges by inflammation and deafferentation, except in a small time-window following the birth of adult-born neurons. These results call for investigations on the mechanisms of phagocytic activity of microglia in adult neurogenesis, thus permanently shaping neuronal connexions in the healthy and pathological OB.

Acknowledgements

The authors thank the *Imagopole-Plateforme d'Imagerie Dynamique France*–BioImaging infrastructure for access to the CV1000 system. They acknowledge Jean-Marc Cavaillon, Catherine Fitting, Elena Braginskaja, Wendy Limousin, Soham Saha and Justine Daniault for their contribution.

Funding: This work was supported by the *Agence Nationale de la Recherche (ANR)* *"*ANR-BLANC-SVSE4-2015" (CE37_2015_SmellBrain), and the French *Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche* (fellowship support to M.D).

References

Alonso, M., et al., 2012. Activation of adult-born neurons facilitates learning and memory. Nat. Neurosci. 15, 897–904.

Breton-Provencher, V., et al., 2014. Activity of the Principal Cells of the Olfactory Bulb Promotes a Structural Dynamic on the Distal Dendrites of Immature Adult-Born Granule Cells via Activation of NMDA Receptors J. Neurosci. 34 (5), 1748–1759.

Chesnokova, V., et al., 2016, Chronic Peripheral Inflammation, Hippocampal Neurogenesis, and Behavior. Brain Behav. Immun., in press.

Hughes, V., 2012. Microglia: The constant gardeners. Nature 485, 570–572.

Imayoshi, I., et al., 2008. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. Nat. Neurosci. 11, 1153–1161.

Kapetanovic, R., et al., 2010. Contribution of NOD2 to lung inflammation during *Staphylococcus aureus*-induced pneumonia. Microbes infect. 12, 759-767.

Kiyokage, E., et al., 2010. Molecular identity of periglomerular and short axon cells. J. Neurosci. 30, 1185–1196.

Lazarini, F., Lledo, P.-M., 2011. Is adult neurogenesis essential for olfaction? Trends Neurosci. 34, 20–30.

Lazarini, F., et al. 2012. Early activation of microglia triggers long-lasting impairment of

adult neurogenesis in the olfactory bulb. J. Neurosci. 32, 3652–3664.

Lazarini, F., et al. 2014. Adult neurogenesis restores dopaminergic neuronal loss in the olfactory bulb. J. Neurosci. 34,14430–14442.

Lepousez, G., et al. 2014. Olfactory learning promotes input-specific synaptic plasticity in adult-born neurons. Proc Natl Acad Sci USA 111(38), 13984-9.

Liu, Y., et al., 2005. LPS receptor (CD14): A receptor for phagocytosis of Alzheimer's amyloid peptide. Brain 128, 1778-1789.

Lledo, P.-M., et al., 2006. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. Nat. Rev. Neurosci. 7, 179–193.

Marín-Teva, et al., 2004. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. Neuron 41, 535–547.

Mouret, A., et al., 2008. Learning and survival of newly generated neurons: when time matters. J. Neurosci. 28, 11511–11516.

Nimmerjahn, A., et al., 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science 308, 1314–1318.

Paolicelli, R.C., et al., 2011. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. Science 333, 1456–1458.

Petreanu, L., et al., 2002. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. J. Neurosci. 22, 6106–6113.

Qin, L., et al., 2007. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. Glia 55, 453-462.

Sakamoto, M., et al., 2014. The functional significance of newly born neurons integrated into olfactory bulb circuits. Neurogenesis 8, 121.

Schafer, D.P., et al., 2012. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. Neuron 74, 691–705.

Sierra, A., et al., 2010. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through

apoptosis-coupled phagocytosis. Cell Stem Cell 7, 483–495.

Siopi, E., et al., 2016. Anxiety- and Depression-Like States Lead to Pronounced Olfactory Deficits and Impaired Adult Neurogenesis in Mice. J. Neurosci. 36, 518–531.

Ueno, M., et al., 2013. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. Nat. Neurosci. 16, 543–551.

Valley, MT, et al., 2013. Adult neurogenesis produces neurons with unique GABAergic synapses in the olfactory bulb. J Neurosci 33(37), 14660-5.

Wu, Y., et al., 2015. Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. Trends Immunol., Special Issue: Neuroimmunology 36, 605–613.

Yamaguchi, M., Mori, K., 2005. Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102(27), 9697-9702.

Figure 1

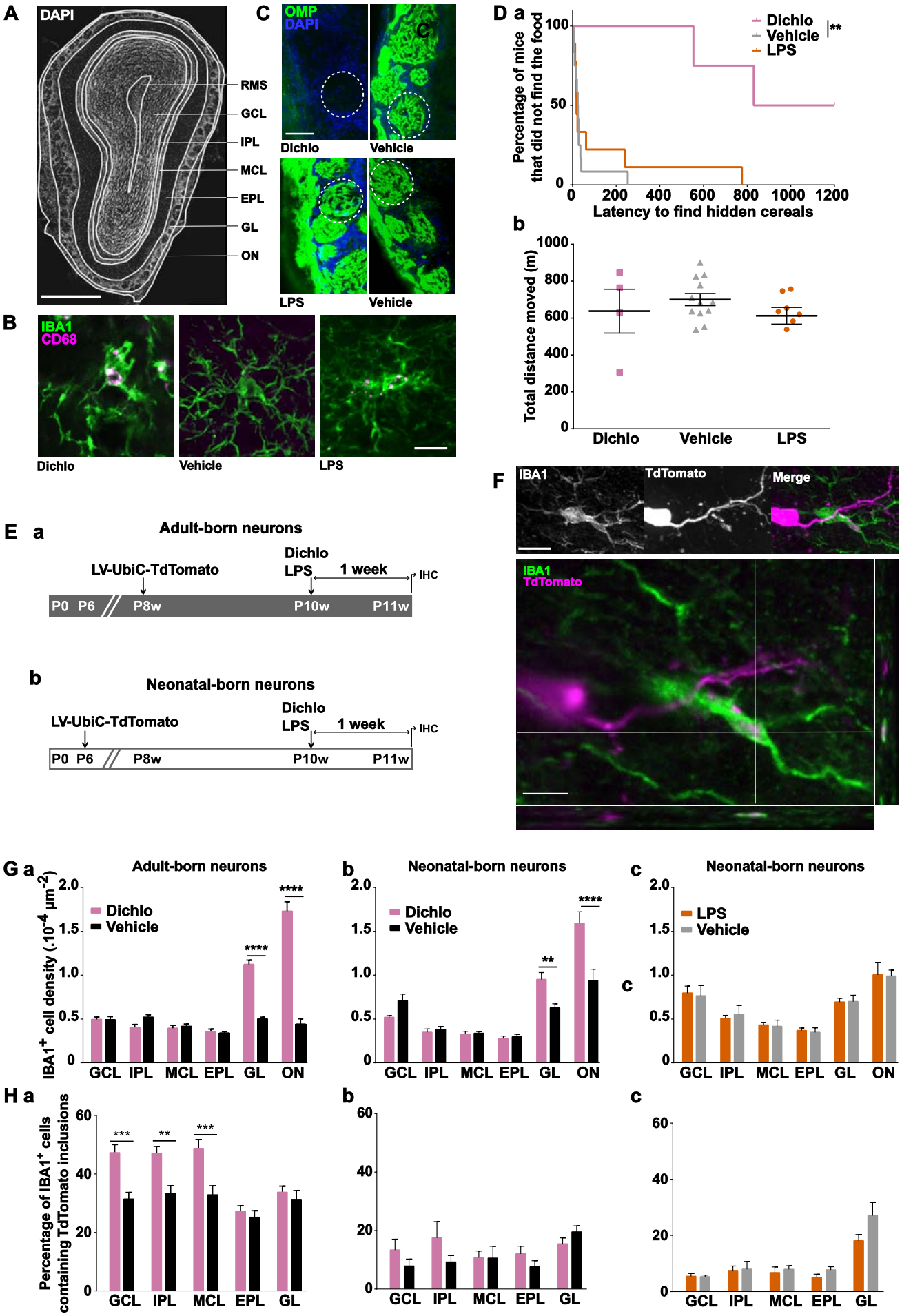

A
DAPI
RMS
GCL
IPL
MCL
EPL
GL
ON
C
OMP
DAPI
Dichlo
Vehicle
LPS
Vehicle
B
IBA1
CD68
Dichlo
Vehicle
LPS
D a
Percentage of mice that did not find the food
Latency to find hidden cereals
Dichlo
Vehicle
LPS
**
b
Total distance moved (m)
Dichlo
Vehicle
LPS
E a
Adult-born neurons
LV-UbiC-TdTomato
Dichlo
LPS
1 week
IHC
P0 P6 P8w P10w P11w
b
Neonatal-born neurons
LV-UbiC-TdTomato
Dichlo
LPS
1 week
IHC
P0 P6 P8w P10w P11w
F
IBA1
TdTomato
Merge
IBA1
TdTomato
G a
Adult-born neurons
IBA1+ cell density (.10-4 µm-2)
Dichlo
Vehicle
GCL IPL MCL EPL GL ON
b
Neonatal-born neurons
Dichlo
Vehicle
GCL IPL MCL EPL GL ON
c
Neonatal-born neurons
LPS
Vehicle
GCL IPL MCL EPL GL ON
H a
Percentage of IBA1+ cells containing TdTomato inclusions
GCL IPL MCL EPL GL
b
GCL IPL MCL EPL GL
c
GCL IPL MCL EPL GL

Figure 1: Differential phagocytosis of adult-born and neonatal-born neurons by microglia.

(A) OB coronal slice stained with DAPI, showing the different layers of the OB; scale bar: 300 µm. (B) Representative images of CD68 staining in the GL 3 days after treatment with Dichlo, LPS or respective vehicles; scale bar: 20 µm. (C) Representative staining of coronal OB slices with OMP antibody, showing the projections of olfactory sensory neurons on the glomeruli of the GL; upper panel: Vehicle = DMSO; lower panel: Vehicle = intranasal saline; dotted circle: one glomerulus; scale bar: 50 µm. (D) Behavioral assessments (n=4-12); (a) latency to find hidden cereals in the buried food finding test (at 3 d.p.i. of Dichlo or LPS); (b) total distance moved in open field (at 6 d.p.i.). (E) Experimental design of assessment of adult-born (a) and neonatal-born (b) neurons phagocytosis. (F) Example of $IBA1^+$ microglia containing $TdTomato^+$ neuronal inclusions; upper panel: maximum intensity projection; lower panel: single plane showing colocalization; scale bar: 20 µm. (G) Density of $IBA1^+$ cells in different layers of the OB: (a) in mice injected with lentivirus at P8w (n=8); (b) in mice injected with lentivirus at P6d (n=6-8); (c) in mice injected with lentivirus at P6d (n=6-11). (H) Proportion of $IBA1^+$ cells containing adult-born (a) or neonatal-born (b,c) neuronal inclusions; (a) n=8; (b) n=5-8; (c) n=6-11. **$p<0.01$, ***$p<0.001$, ****$p<0.0001$.

Figure 2

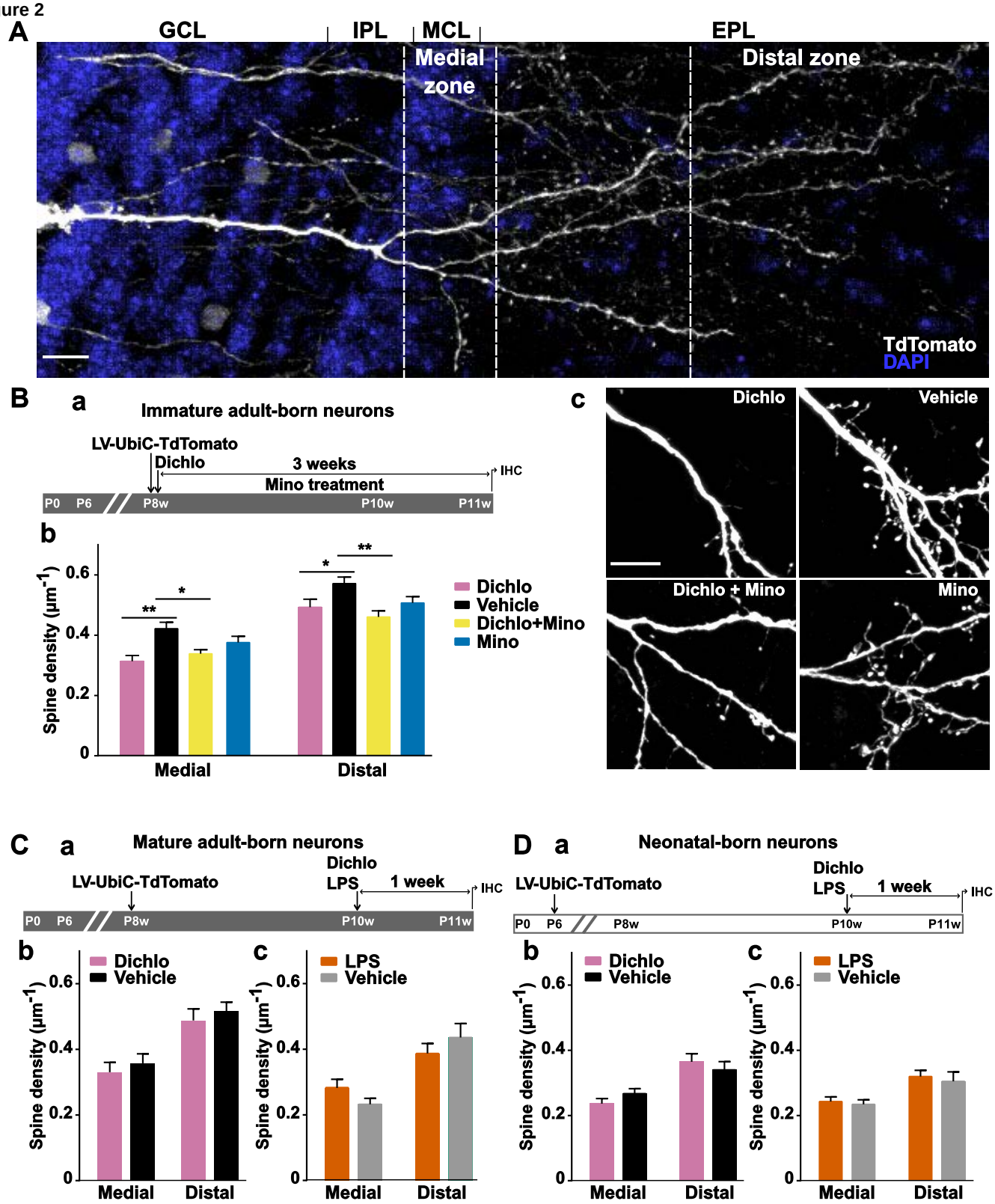

A
GCL
IPL
MCL
EPL
Medial zone
Distal zone
TdTomato
DAPI
B
a
Immature adult-born neurons
LV-UbiC-TdTomato
Dichlo
3 weeks
Mino treatment
IHC
P0
P6
P8w
P10w
P11w
b
Spine density (μm-1)
0.6
0.4
0.2
0
Medial
Distal
Dichlo
Vehicle
Dichlo+Mino
Mino
c
Dichlo
Vehicle
Dichlo + Mino
Mino
C
a
Mature adult-born neurons
LV-UbiC-TdTomato
Dichlo
LPS
1 week
IHC
P0
P6
P8w
P10w
P11w
b
Dichlo
Vehicle
Spine density (μm-1)
Medial
Distal
c
LPS
Vehicle
Spine density (μm-1)
Medial
Distal
D
a
Neonatal-born neurons
LV-UbiC-TdTomato
Dichlo
LPS
1 week
IHC
P0
P6
P8w
P10w
P11w
b
Dichlo
Vehicle
Spine density (μm-1)
Medial
Distal
c
LPS
Vehicle
Spine density (μm-1)
Medial
Distal

Figure 2: Sensory deprivation alters spine density of adult-born GCs in an age-dependent manner.

(A) Coronal section of OB showing the two zones considered for spine density analysis of GCs; scale bar: 40 µm. (B) Timeline (a), corresponding spine density quantification (b) and representative pictures of the medial dendritic portion (c) of adult-born neurons, in mice treated with Dichlo or Dichlo+Mino the day after neuronal labelling (n=45-48); scale bar: 5 µm. (C) Timeline (a) and spine density quantification (b, c) of adult-born neurons, in mice treated two weeks after neuronal labelling (n=12-32). (D) Timeline (a) and spine density quantification (b, c) of neonatal-born neurons (n=26-33). *$p<0.05$, **$p<0.01$.

II.B Deuxième article : Siopi et al., *Anxiety- and Depression-Like States Lead to Pronounced Olfactory Deficits and Impaired Adult Neurogenesis in Mice*

II.B.1 Contexte

Comme nous l'avons déjà évoqué dans la partie I.C.6.d, l'olfaction est souvent fortement atteinte dans la dépression sévère, mais très peu d'études se sont penchées sur les mécanismes sous-jacents. L'une des conséquences du stress chronique, qui conduit à un phénotype dépressif, est le dérèglement de l'axe HPA et l'élévation du taux de glucocorticoïdes (voir I.A.5.a.iii).

Dans cette étude, nous avons utilisé l'apport exogène de corticostérone pour produire un modèle murin de dépression. Nous avons étudié l'impact de la corticostérone sur les néo-neurones du bulbe olfactif dans ce modèle de dépression, plus particulièrement au niveau de l'arbre dendritique des néo-neurones (Figure 8 de l'article II.B).

Nous avons également recherché si la fluoxétine, inhibiteur de la recapture de la sérotonine fréquemment utilisé comme anti-dépresseur, pourrait restaurer les déficits dûs à la corticostérone chronique.

II.B.2 Résumé

Les patients souffrant de dépression sévère ont souvent des troubles olfactifs associés [Kohli et al., 2016; Negoias et al., 2010; Pause et al., 2001]. Pourtant, les mécanismes physiopathologiques liant perte olfactive et dépression sont mal connus. Nous avons fait l'hypothèse qu'un facteur important dans ce lien est l'hypercortisolémie, qui est un symptôme majeur de la dépression.

L'équivalent du cortisol chez la souris est la corticostérone. Elle est connue pour corréler négativement avec la neurogenèse hippocampique [David et al., 2009; Murray et al., 2008; Snyder et al., 2011], mais les effets sur la neurogenèse adulte bulbaire sont inconnus.

Dans cette étude, nous avons utilisé un modèle murin d'anxiété/dépression basé sur l'administration chronique de corticostérone , et étudié l'effet de l'antidépresseur fluoxétine sur le comportement, l'olfaction et la neurogenèse adulte dans le gyrus dentelé, le bulbe olfactif et l'épithélium olfactif.

Nous avons commencé par confirmer que la corticostérone chronique provoque un phénotype anxio-dépressif chez les souris (Figure 1) [2], qui est annulé par la fluoxétine (Figure 2). La corticostérone induit des déficits dans l'acuité olfactive, la discrimination fine d'odeurs et la mémoire olfactive. Ces déficits sont annulés par la fluoxétine (à l'exception de la discrimination olfactive fine) (Figure 4). Ces déficits ne sont pas dûs à une perte de l'afférence sensorielle, car la corticostérone chronique n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire dans l'épithélium olfactif, ni sur les projection des neurones récepteurs olfactifs sur le bulbe olfactif (Figure 7). La fluoxétine administrée seule affecte légèrement le comportement anxio-dépressif, et induit des déficits olfactifs similaires à la corticostérone chronique seule (Figure 3). La fluoxétine a donc des effets délétères chez le sujet sain.

La prolifération (dans la zone sous-ventriculaire et le gyrus dentelé) et la survie des néo-neurones (dans le bulbe olfactif et le gyrus dentelé) sont diminuées par la corticostérone chronique, et restaurées par la fluoxétine (Figures 5 et 6). La complexité dendritique des néo-neurones du bulbe olfactif et du gyrus dentelé n'est pas affectée par la corticostérone, mais est augmentée par la fluoxétine seule, avec peut être un effet cumulatif de la corticostérone et de la fluoxétine (Figures 5E et 8). La densité des épines dendritiques n'est, quant à elle, affectée par aucun des deux traitements (données non montrées).

Cette étude montre que dans un modèle murin qui imite la suractivation de l'axe HPA et le phénotype anxio-dépressif de la dépression sévère, l'olfaction et la neurogenèse adulte (prolifération, survie et morphologie des néo-neurones) sont touchées. La majorité de ces déficits sont annulés par l'anti-dépresseur fluoxétine. La fluoxétine a en outre un effet propre délétère sur le comportement, l'olfaction et l'arbre dendritique des néo-neurones.

II.B.3 Article

2. Toutes les références à des figures faites dans ce résumé renvoient aux figures de l'article paragraphe suivant (II.B.3).

Development/Plasticity/Repair

Anxiety- and Depression-Like States Lead to Pronounced Olfactory Deficits and Impaired Adult Neurogenesis in Mice

Eleni Siopi,[1,2] Marie Denizet,[1,2] Marie-Madeleine Gabellec,[1,2] Fabrice de Chaumont,[3,4] Jean-Christophe Olivo-Marin,[3,4] Jean-Philippe Guilloux,[5] Pierre-Marie Lledo,[1,2]* and Françoise Lazarini[1,2]*

[1]Institut Pasteur, Unité Perception et Mémoire, F-75015 Paris, France, [2]Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 3571, F-75015 Paris, France, [3]Institut Pasteur, Unité d'Analyse d'Images Quantitative, F-75015 Paris, France, [4]Centre National de la Recherche Scientifique, Unité de Recherche Associée 2582, F-75015 Paris, France, and [5]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR-S 1178, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry F-92296, France

Numerous clinical reports underscore the frequency of olfactory impairments in patients suffering from major depressive disorders (MDDs), yet the underlying physiopathological mechanisms remain poorly understood. We hypothesized that one key link between olfactory deficits and MDD lies in hypercortisolemia, a cardinal symptom of MDD. Corticosterone (CORT) is known to negatively correlate with hippocampal neurogenesis, yet its effects on olfactory neurogenesis and olfaction remain unknown. Here we used a rodent model of anxiety/depression-like states, which is based on chronic CORT administration and studied the effects of the antidepressant fluoxetine (FLX) on behavior, olfaction, and adult neurogenesis in the dentate gyrus (DG), olfactory bulb (OB), and the olfactory epithelium (OE). Chronic CORT had no effect on cell proliferation in the OE or on olfactory sensory neurons projecting to the OB, but induced pronounced deficits in olfactory acuity, fine discrimination of odorants and olfactory memory. These alterations were accompanied by a significant decrease in the number of adult-born neurons in both the DG and OB. Remarkably, FLX not only reversed depression-like states as expected, but also improved olfactory acuity, memory, and restored impaired adult neurogenesis. However, fine olfactory discrimination was not restored. Morphological analysis of adult-born neurons in both the DG and the OB showed that dendritic complexity was not significantly affected by CORT, but was increased by FLX. These findings demonstrate an essential role for glucocorticoids in triggering olfactory impairments in MDD and highlight a novel therapeutic effect of FLX.

Key words: corticosterone; dentate gyrus; olfactory bulb; olfactory epithelium; serotonin; subventricular zone

Significance Statement

Increasing clinical reports show that major depression is characterized by pronounced olfactory deficits, yet the underlying mechanisms remain unknown. In this work, we used an endocrine model of depression to study whether hypothalamic-pituitary-adrenal axis perturbation could be sufficient to provoke olfactory impairments. We found that chronic corticosterone not only induces marked deficits in olfactory acuity, fine discrimination and olfactory memory, but also significantly decreases bulbar and hippocampal neurogenesis. Importantly, the antidepressant fluoxetine restores both adult neurogenesis and depressive states, and improves most olfactory functions. Our data reveal that impairment of hypothalamic-pituitary-adrenal axis during depression can lead to olfactory deficits and that the neurogenic effects of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants can successfully restore certain olfactory functions.

Introduction

Major depressive disorders (MDDs) are highly prevalent and debilitating conditions, whose pathophysiological mechanisms and response to treatments remain poorly understood (Krishnan and Nestler, 2008). Increasing clinical reports underscore the frequency of olfactory impairments in patients suffering from MDDs (Pause et al., 2001; Negoias et al., 2010), yet, it remains

Received July 27, 2015; revised Nov. 12, 2015; accepted Nov. 30, 2015.

Author contributions: E.S., P.-M.L., and F.L. designed research; E.S., M.D., M.-M.G., and F.L. performed research; F.D.C., J.-C.O.-M., and J.-P.G. contributed unpublished reagents/analytic tools; E.S., M.D., M.-M.G., and F.L. analyzed data; E.S., P.-M.L., and F.L. wrote the paper.

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche "ANR-SAMENTA 2012," the "Laboratory for Excellence" programs "Revive" and "BioPsy," as well as the life insurance company "AG2R."; E.S. is supported by a postdoctoral grant from ANR-SAMENTA; and the Imagopole-Plateforme d'Imagerie Dynamique France bioimaging infrastructure, supported by the French National Research Agency (ANR 10-INSB-04-01, Investments for the Future), for advice and access to the CV1000 system. We thank Raphaël Servignat d'Août for his contribution in the behavioral assays, Gabriel Lepousez for his technical help in olfactory epithelium analysis, and Denis David, Alain Gardier, and Emmanuelle Corruble for fruitfull comments on this project. Pierre-Marie Lledo's laboratory is part of the École des Neurosciences de Paris Ile-de-France network.

unclear how mood states and olfactory processes interact in psychiatric disorders such as MDDs.

Olfactory deficits in MDDs could be partly due to endocrine dysfunction, which is suspected to play a key role in anxiety/depressive disorders. In fact, ~80% of severely depressed patients exhibit chronic hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, mainly reflected by an excess of plasma cortisol (Anacker et al., 2011). This phenomenon is modeled in rodents, which show HPA axis abnormalities and increased corticosterone (CORT) levels upon unpredictable chronic mild stress, early life stress, or chronic social stress (Lehmann et al., 2013). Both the hippocampus and the olfactory bulb (OB) are densely populated with receptors for glucocorticoids (Morimoto et al., 1996). Although the effects of glucocorticoids in the adult OB remain relatively unknown, they play an important role in the hippocampus by negatively regulating the HPA axis, resulting in stress resilience. In conditions of chronic stress, when there is a sustained overproduction of glucocorticoids, this inhibitory feedback is impaired, creating a cascade of hippocampal damage and resulting in maladaptive stress responses (Selye, 1950; Mirescu and Gould, 2006).

Abundant evidence suggests that chronic stress is highly regulated by adult hippocampal neurogenesis (Dranovsky and Hen, 2006). In rodents, adult neurogenesis is a key mechanism to maintain plasticity in response to both internal and environmental challenges (Lledo et al., 2006), and its functional relevance ranges from perceptive to cognitive functions, including mood regulation, pattern separation, learning, memory, and behavioral responses to olfactory cues (Breton-Provencher et al., 2009; Lazarini and Lledo, 2011; Alonso et al., 2012). Abnormal hippocampal neurogenesis is likely to participate in psychiatric disorders, such as depression (Sahay and Hen, 2007), and the production of adult-born hippocampal neurons is influenced by stress and glucocorticoids (Murray et al., 2008; David et al., 2009; Snyder et al., 2011). In MDD patients and mouse models of chronic stress, there is evidence for reduced hippocampal volume and impaired adult neurogenesis, both of which can be restored by antidepressant treatments (Campbell et al., 2004; Boldrini et al., 2009). Moreover, adult hippocampal neurogenesis is required for the response to antidepressants (Santarelli et al., 2003; David et al., 2009), and adult-born neurons are essential in restoring hippocampal inhibitory control over the HPA axis and in normalizing glucocorticoid levels following chronic stress (Snyder et al., 2011).

In this work, we determine whether such a link could be also drawn between HPA axis dysfunction and olfactory neurogenesis. In rodents, newborn neurons from the lateral wall of the subventricular zone (SVZ) migrate *en route* to the OB, where they differentiate into bulbar interneurons. The few existing studies on the impact of chronic stress on olfactory neurogenesis show mixed results. While prolonged mild stress or CORT treatment has been shown to decrease cell proliferation in the SVZ (Hitoshi et al., 2007; Lau et al., 2011), there is contradictory evidence that the latter is not sensitive to repeated stress (Chen et al., 2006; Surget et al., 2008). Nevertheless, clinical studies have reported that adults with a history of childhood stress or MDD can have reduced OB volume (Negoias et al., 2010; Croy et al., 2013), suggesting a potential impact of chronic stress on OB functioning.

To investigate whether defects in the HPA axis could alter olfactory neurogenesis and olfaction, we used a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression (David et al., 2009). We found that chronic CORT affects adult neurogenesis and induces both anxiety/depression-like states and olfactory impairments. We then report that coadministration of the antidepressant fluoxetine (FLX), a selective serotonin reuptake inhibitor, restores adult neurogenesis and attenuates the olfactory deficits.

Materials and Methods

Subjects

Experiments were performed using adult male C57BL/6Ntac mice (8 weeks old, 20–25 g), purchased from Taconic Farms. They were housed in groups of five and maintained in standard conditions (controlled room temperature and humidity, 12 h light/dark cycle, with lights on at 8:00 A.M., *ad libitum* access to dry food pellets and water) at the Pasteur Institute animal care facility, officially registered for experimental studies on rodents (approval number for animal care facilities: A 75-15-01-6 2014-720). These studies were performed in compliance with the French legislation (Decree of Feb 1, 2013, 2013-118) and the European Communities Council Directive of Sept 22, 2010 (2010/63/EEC). Experimental designs and procedures were approved by the local ethics committee (no. 2011-0020, CETEA 59 and no. 2013-0081, CETEA 89).

Drugs

The dose of CORT and FLX treatments was selected upon previous studies (David et al., 2009). CORT (4-pregnen-11b-diol-3 20-dione 21-hemisuccinate, from Sigma-Aldrich) was dissolved in its vehicle (0.45% hydroxypropyl-β-cyclodextrin, β-CD, Sigma-Aldrich) and was available *ad libitum* in drinking water (35 μg/ml/d, equivalent to ~5 mg/kg/d). FLX (Anawa Trading, 18 mg/kg/d) was delivered either with the vehicle or with CORT. During the period of water restriction, CORT was administered intraperitoneally (i.p.) as previously described (Harris et al., 2011).

Design and treatment groups

Mice were divided in a total of 11 treatment groups (total $n = 105$) for four separate experimental sets.

Experimental set 1. Impact of CORT and FLX on behavior, olfaction and adult neurogenesis (Figs. 1, 2, 4–6). One group received the vehicle ($n = 12$) for 20 weeks and the second group received CORT ($n = 20$) for 20 weeks. The third group received CORT during 6 weeks and then CORT+FLX during 14 weeks ($n = 35$). Using standard behavioral tests, we confirmed the anxious-depressive phenotype of mice at 4 weeks of CORT treatment (Fig. 1). One test per day was performed in the following order: open field, elevated plus maze, novelty suppressed feeding and splash test. Then, olfactory tests were conducted at the eighth week of CORT treatment, using fewer mice in each group (vehicle group: $n = 8$; CORT group: $n = 8$; CORT+FLX group: $n = 35$). The choice of mice was random and the remaining animals were eliminated from the study. Following 1 week of training in the olfactometers, olfactory tests lasted 5 weeks (Fig. 3). Olfactory perception was assessed 4 weeks following the onset of FLX administration. Simple and difficult olfactory discrimination (carvones and carvone mixtures) was assessed at 6 and 7 weeks, respectively, following the onset of FLX treatment. Finally, olfactory memory was assessed at 12 weeks following the onset of FLX treatment. All mice ($n = 51$) were subjected to behavioral essays at week 16 of CORT onset (1 test per day, as follows: open field, elevated plus maze, novelty suppressed feeding, splash test, tail suspension test, and forced swim test; Fig. 2) and to an olfactory memory test at week 18 (Fig. 3*F*). Immunohistochemistry was performed at week 20 using 10 mice from the CORT+FLX group, five mice from the vehicle group and five mice from the CORT-treated group, that were randomly chosen (see Figs. 5, 6).

Experimental set 2. Impact of chronic FLX on behavior (Fig. 3). One group received the vehicle ($n = 10$) and the other group received FLX

The authors declare no competing financial interests.

* P.-M L. and F.L. contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to either Dr Pierre-Marie Lledo or Dr Françoise Lazarini, Perception and Memory Laboratory, Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, F-75724 Paris Cedex 15, France, E-mail: pmlledo@pasteur.fr or lazarini@pasteur.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.2817-15.2016

Copyright © 2016 the authors 0270-6474/16/360519-14$15.00/0

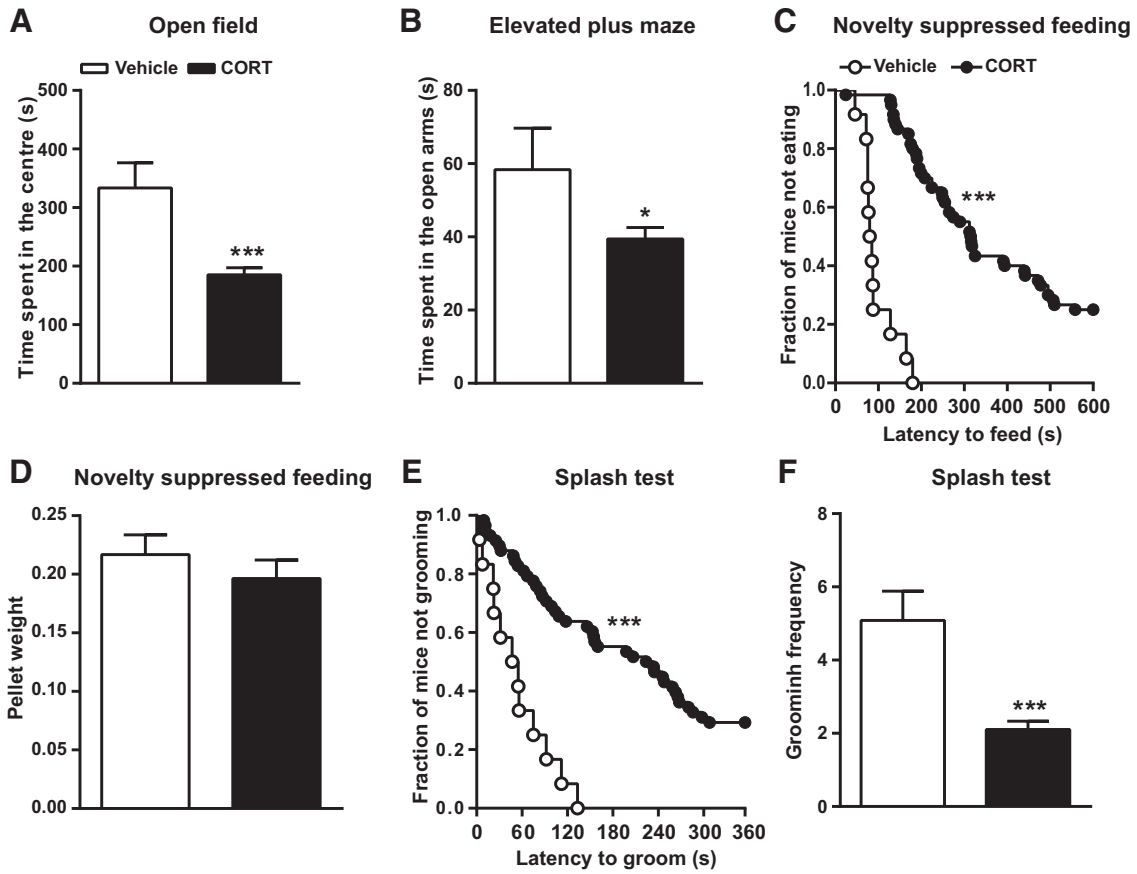


Figure 1. Chronic CORT treatment induces anxiety and depression-like states. Following 4 weeks of CORT administration, anxiety, and depression-like behaviors were assessed using the open field, elevated plus maze, novelty suppressed feeding test, and splash test. CORT decreased the time spent (***A***) in the center of the open field and (***B***) in the open arms of the elevated plus maze. ***C***, Graph showing the latency to feed in the novelty suppressed feeding paradigm, presented as the fraction of mice that did not eat over a period of 10 min. ***D***, CORT did not affect feeding drive. ***E***, CORT-treated mice displayed an increased latency to groom in the splash test. ***F***, The total number of grooming sessions within the 6 min trial was significantly decreased by CORT. Values are plotted as mean ± SEM ($n = 12$ for vehicle-treated and $n = 55$ for the CORT group). *$p < 0.05$, ***$p < 0.001$ compared with vehicle-treated.

($n = 10$) for 14 weeks (Fig. 3*A*). Olfactometry was performed following 2 weeks of FLX treatment and lasted 6 weeks. Mice were then subjected to behavioral analysis at week 10 (1 test per day as follows: open field, elevated plus maze, novelty suppressed feeding, splash test, tail suspension test and forced swim test) and to an olfactory memory test at week 12.

Experimental set 3. Impact of CORT on cell proliferation in the olfactory epithelium (see Fig. 7). Immunohistochemistry was done using two groups of mice, one group that was treated with CORT during 4 weeks ($n = 5$) and a group that received the vehicle ($n = 5$).

Experimental set 4. Impact of FLX on the morphology of adult-born OB neurons in CORT-treated and naive mice (see Fig. 8). The first group ($n = 4$) received the vehicle and the second group ($n = 4$) received CORT during 11 weeks. The third group received CORT during 4 weeks and then CORT+FLX during 7 weeks ($n = 4$). The fourth group ($n = 4$) received the vehicle during 4 weeks and then FLX during 7 weeks (see Fig. 8*A*). A lentiviral vector was injected in the SVZ at week 8 to label adult newborn neurons (see Fig. 8*C*). Immunohistochemistry was performed at week 11.

Behavioral assessment

A battery of behavioral tests was used for the mice included in experimental sets 1 and 2, to assess locomotor activity, anxiety and depression-like behavior and olfaction.

Open-field. Animals were placed in white Plexiglas containers (43 × 43 cm^2) and their behavior was recorded by a video camera during 30 min. A tracking system (Noldus Ethovision 3.0) was used to map center and periphery zones and to calculate the time spent in each zone.

Elevated plus maze. The test was conducted using a plus-cross-shaped apparatus made of black Plexiglas that was elevated 58 cm above the floor and comprised two open and two closed arms (30 × 6 cm) that extended from a central platform (7 × 7 cm). The Noldus Ethovision 3.0 tracking system was used to record behavior for 6 min. The time spent and entries in center, open arm, and closed arm zones were calculated.

Novelty suppressed feeding. The test container used was a white plastic box (50 × 50 × 20 cm) whose floor was covered by wooden bedding. Twenty-four hours prior testing, all food was removed from the home cage. A single food pellet (regular chow) was adhered on a piece of Whatman paper and positioned in the center of the container that was brightly illuminated. The latency to eat was measured during 10 min as previously described (David et al., 2009). At the end of each session, the animals were immediately transferred into their home cage and the amount of food consumed over the subsequent 5 min period, as well as their body weight, were measured as a control of feeding drive.

Splash test. The test consisted in squirting ~200 μl of a sucrose solution on the dorsal coat of the mouse, as previously described (Surget et al., 2008). Grooming latency, frequency, and duration were assessed during 6 min.

Tail suspension test. Mice were suspended by the tail using adhesive tape on a metal rod of an automated tail suspension apparatus (Bioseb), as previously described (Cryan et al., 2005). Immobility time and power of movement were recorded during a 6 min period.

Forced swim test. The test was performed using an automated forced swim test software (Bioseb), as previously described (Garza et al., 2012). Total immobility time, swimming, and climbing states were measured during a 6 min session.

Olfactometry

Mice were partially water-deprived for 1 week and were then trained using an operant conditioning go/no-go procedure in computer-controlled olfactometers (Fig. 4*A*) as described previously (Alonso et al.,

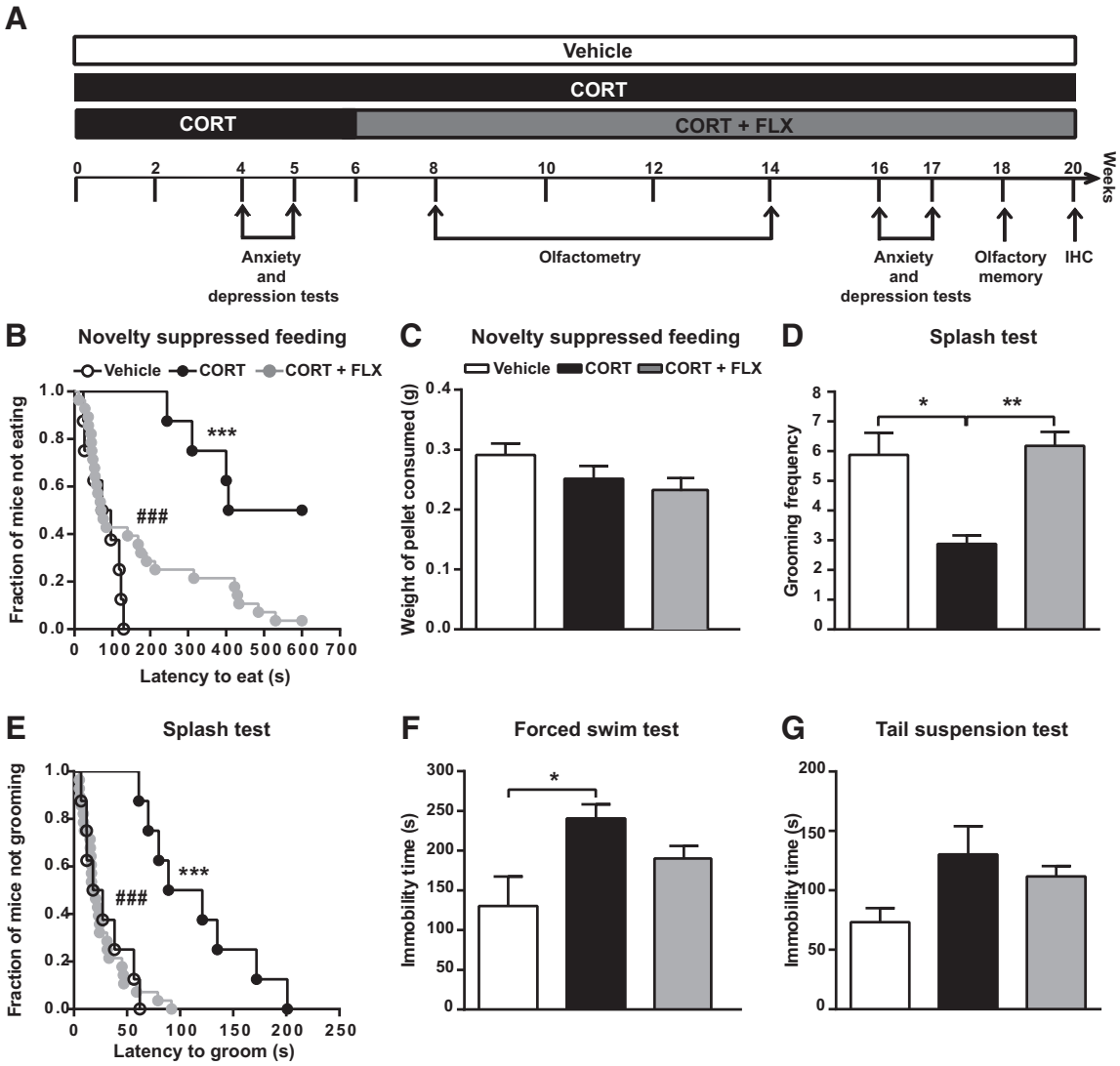


Figure 2. Effects of FLX on CORT-induced anxiety- and depression-like states. ***A***, Diagram depicting experimental groups and study design. Animals were tested in the open field, elevated plus maze, novelty suppressed feeding, splash test, tail suspension test, and forced swim test paradigms successively, with a 1 d interval. ***B–G***, Following 16 weeks of CORT and 10 weeks of CORT+FLX treatment, (***B***) the latency to eat in the novelty suppressed feeding paradigm was significantly increased by CORT and attenuated by FLX. ***C***, Neither CORT nor CORT+FLX induced any change in feeding drive, reflected by the amount of pellet consumed during 5 min after the test. ***D***, ***E***, CORT-treated mice displayed both increased grooming latency and decreased grooming frequency in the splash test, which were abrogated by FLX. ***F***, ***G***, Average immobility time was not significantly affected by CORT in the tail suspension test, but it was notably increased in the forced swim test. FLX did not induce any statistically significant effect. Values are plotted as mean ± SEM ($n = 8$ for the vehicle and CORT groups, $n = 35$ for the CORT + FLX group). $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, $^{###}p < 0.001$. IHC, Immunohistochemistry.

2012; www.olfacto-meter.com). In this paradigm, mice were trained to respond to the presence of a rewarded stimulus odorant (S^+) by licking the water delivery tube, and to refrain from responding to the presence of non-rewarded stimulus odorant (S^-). A response in an S^+ trial and an absence of response in an S^- trial were scored as correct. Accuracy was scored for each block of 20 trials. Mice were subjected to a daily session of eight blocks. Monomolecular odorant compounds and binary odorant mixtures (Sigma-Aldrich), were diluted either in water or in mineral oil (MO), and 10 ml of the resulting solution was used as the odorant source.

Olfactometry was performed in the following order: (1) training and discrimination of isoamyl-acetate (IAA) versus MO (1st and 2nd weeks), (2) odorant (*N*-butanol) detection threshold (3rd and 4th weeks), and (3) carvone and carvone mixture discrimination (5th and 6th weeks). Olfactory memory was assessed in one session following a 4 week interval from the end of the 5th week.

In the odorant detection threshold test, mice were tested for their ability to detect successively descending decimal concentrations of *N*-butanol (S^+) diluted in water (S), starting with a concentration of 0.01%. The session ceased at the achievement of criterion performance (≥75% of correct responses in at least one block). The odorant detection threshold test ceased when the criterion performance was not achieved after three successive sessions with the same odorant dilution. The accuracy criterion (≥75% of correct responses in at least 1 block) was used to calculate odorant detection threshold.

In the odorant mixture discrimination tasks, mice were trained to distinguish between two carvone enantiomers diluted in MO: 0.1% carvone$^+$ (S^+) and 0.1% carvone$^-$ (S^-). Carvones belong to the terpenoid family and are food scents. S^+-carvone smells like caraway (*Carum carvi*) and *Anethum graveolens*, whereas S^--carvone smells like spearmint. Mammals, including humans, are able to spontaneously discriminate between the two carvone enantiomers (Linster et al., 2002). Mice were then tested in two discrimination tasks including carvone mixtures. In the first task, S^+ was attributed to a solution of 80% carvone$^+$ and 20% carvone$^-$, and S^- to a solution of 20% carvone$^+$ and 80% carvone$^-$. In the second task, the S^+ odorant was a solution of 60% carvone$^+$ and 40% carvone$^-$, whereas S^- was a solution of 40% carvone$^+$ and 60% carvone$^-$.

For the olfactory memory task, mice underwent eight blocks of 20 trials every day for 5 consecutive days, to recall distinguishing between

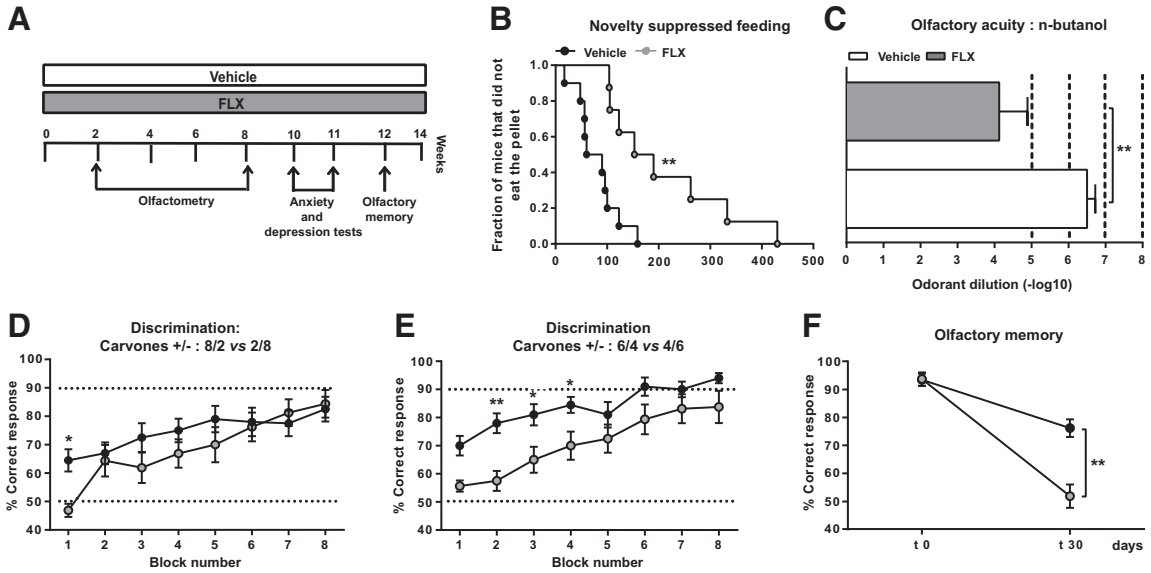


Figure 3. Chronic FLX affects anxiety/depression-like states and impairs olfaction. ***A***, Diagram showing experimental groups and study design. ***B***, When administered alone, chronic FLX generated some anxiety and depression-related behaviors in otherwise naive mice, mainly an increase in feeding latency in the novelty suppressed feeding paradigm. ***C***, Chronic FLX impaired olfactory acuity since FLX-treated mice required significantly higher concentrations of *N*-butanol for odorant detection compared with vehicle-treated animals. Mice treated with FLX displayed a poorer learning rate compared with vehicle-treated animals in ***D*** the 80/20 versus 20/80 carvone mixture task, albeit reaching the same final score. ***E***, In the more difficult discrimination task of 60/40 versus 40/60 carvone mixtures, FLX-treated mice displaying a weaker learning rate as well as a lower final score. ***F***, To assess olfactory memory, mice were trained to distinguish between carvone $^{+}$ and carvone $^{-}$ during 5 consecutive days. Mice were then retested for the carvone discrimination task at 30 d (t 30) following the end of the training session (t 0). FLX-treated animals exhibited an olfactory memory deficit. Values are plotted as mean ± SEM ($n = 8–10$/group). $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$.

carvone $^{+}$ and carvone $^{-}$. Then, mice were tested on the same task after a rest period of 4 weeks, in one block of 20 trials, but with no reward given for a correct response.

Bromodeoxyuridine injections. Mice were intraperitoneally injected with a DNA synthesis marker, bromodeoxyuridine (BrdU; 100 mg/kg, Sigma-Aldrich). They received one injection 2 h before perfusion for the analysis of cell proliferation, or four injections, at 2 h intervals, on a single day, 4 weeks before perfusion, for the analysis of cell survival.

Stereotaxic lentiviral injections

To study the morphology of adult-born neurons, a replication-deficient lentiviral vector expressing green fluorescent protein (GFP) under control of the cytomegalovirus (CMV) promoter (LV-CMV-GFP with a viral titer of 109 units/ml) was used as previously described (Lazarini et al., 2014). The concentration of lentiviral vector particles used for injection was 13.8 ng of viral antigen per microliter assayed by ELISA ($\sim 10^{10}$ transduction units per milliliter). The LV-CMV-GFP vector was prepared at the ENP vector platform (www.paris-neuroscience.fr). Mice were deeply anesthetized by a mixture of ketamine and xylazine (100 mg/kg ketamine, 16 mg/kg xylazine). Small craniotomies were performed above the injection sites using a dentist drill. We performed bilateral virus injections (200 nl per site) into the rostral migratory stream (RMS) at +3.30 mm anteroposterior and ±0.82 mm mediolateral from bregma, and −2.90 mm dorsoventral from skull surface, to label SVZ-generated neuroblasts that migrate toward the OB. Mice were then transferred to their home cage for recovery.

Immunohistochemistry

Mice were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (i.p., 100 mg/kg, Sanofi) and perfused transcardially with a solution containing 0.9% NaCl and heparin (5×10^{3} U/ml, Sanofi-Synthelabo) at 37°C, followed by 4% paraformaldehyde in phosphate buffer, pH 7.3. Olfactory epithelia (OE) and brains were removed and postfixed by incubation in the same fixative at 4°C overnight. OE were cryoprotected by incubation in 30% sucrose in PBS for 24 h, and then embedded in Tissue-tek (Sakura). OE 20-μm-thick coronal sections were obtained using a cryostat (CM3050S, Leica) and were thaw-mounted onto coated glass slides (Superfrost Plus). Forty-micrometer-thick coronal brain sections were obtained using a vibrating microtome (VT1000S, Leica). In the experiments using viral labeling of neuroblasts, 60-μm-thick coronal sections were prepared. Immunostaining was performed on free-floating sections for brain slices and fixed sections for OE. Nonspecific staining was blocked by 0.2% Triton, 4% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) and 2% goat serum. Slices were first incubated with primary antibodies at 4°C overnight, and then with secondary antibodies (biotinylated or AlexaFluor-conjugated secondary antibodies, Jackson ImmunoResearch Laboratories) at room temperature. Primary antibodies used in this study and their working dilutions are listed in Table 1.

For doublecortin (DCX) immunolabeling, brain sections were preincubated in citrate buffer (10 mM, pH 9.0) at 80°C for 20 min. For Ki67 immunostaining, OE sections were preincubated in citrate buffer (10 mM, pH 6.0) at 80°C for 20 min. For BrdU staining, DNA was denatured with 2N HCl at 37°C for 30 min. Fluorescent sections were stained with the nuclear dye 4′,6′-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and then mounted in a solution of 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano (Sigma-Aldrich). Immunoperoxidase-labeled cells were detected with a peroxidase-conjugated secondary antibody (ABC system, Vector Laboratories), using biotinylated donkey anti-rat, goat anti-rabbit or horse anti-goat IgG (1:200, Vector Laboratories) and 3,39-diaminobenzidine (0.05%) as a chromogen (Sigma-Aldrich).

For morphologic analysis of adult-born neurons in the OB, the labeling was enhanced with a GFP immunostaining (rabbit anti-GFP primary antibody, 1/1000, and goat anti-rabbit second antibody, 1/500, Invitrogen). DAPI (1/5000) was used as a nuclear stain.

Image acquisition and quantification analysis

Immunofluorescence was analyzed using a confocal laser-scanning microscope (LSM 710; Zeiss) with Zen Imaging software (Zeiss) and a confocal spinning disk Cell Voyager (CV1000, Yokogawa). For the analysis of immunoperoxidase-labeled cells, reconstructed images of the dentate gyrus (DG), SVZ, and OB were taken using an Olympus BX51 microscope (20× objective) and the Compix Imaging software (Hamamatsu Photonics).

Quantification was performed using the Icy open source platform (http://www.icy.bioimageanalysis.org; Olivo-Marin, 2002; de Chaumont et al., 2012). The internal and external borders of the RMS, the glomerular layer (GL), and granule cell layer (GCL) of the OB were

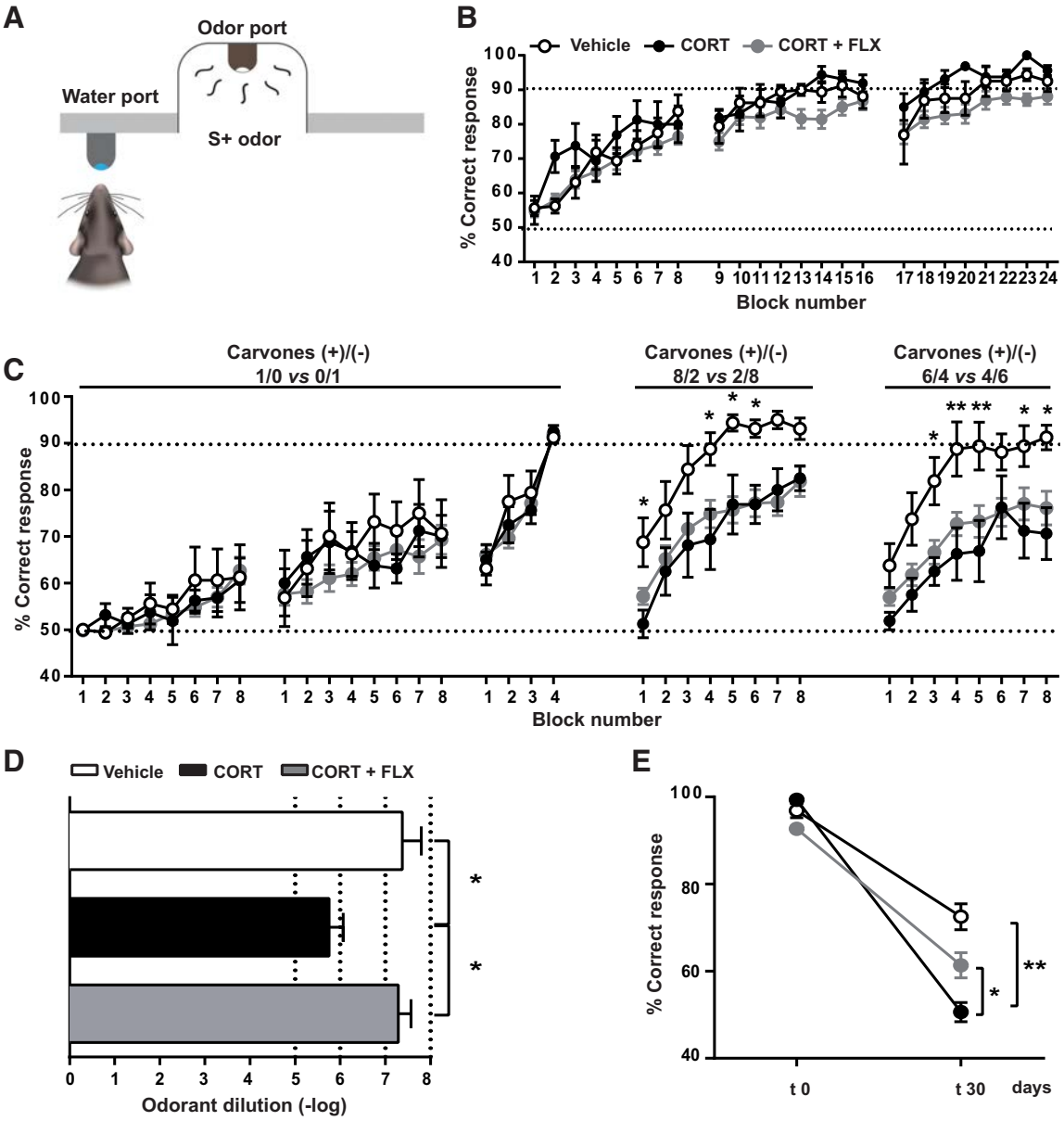


Figure 4. Chronic CORT induces multiple olfactory deficits most of which are restored by FLX. ***A***, Go/no-go procedure. In response to a positive odor stimulus (S^+), the trained mouse licks the water port to receive the water reward. ***B***, Graph showing the mean percentage of correct responses in each block of the discrimination task between 1% IAA and 1% MO. All groups of mice reached criterion performance, which corresponds to 90% of correct responses in at least one block. A score of 50% corresponds to the success rate at chance level. ***C***, Graph depicting the mean percentage of correct responses in each block of the discrimination task between two carvone enantiomers and their mixtures. To further evaluate olfactory discrimination, we trained mice to discriminate mixtures of increasing complexity. Mice were first trained to distinguish 1% carvone $^+$ and 1% carvone $^-$. Once mice reached this criterion, they were subjected to the more difficult task of mixture discrimination. The mixture ratio of carvone $^+$ and carvone $^-$ is indicated on the graph. All groups showed similar performance in the simple discrimination task of carvone $^+$ versus carvone $^-$. However, the ability to discriminate between carvone mixtures was reduced by CORT and not restored by FLX. ***D***, CORT-treated mice required significantly higher concentrations of *N*-butanol for odorant detection compared with vehicle-treated and CORT + FLX-treated animals. ***E***, To assess olfactory memory, mice were trained during 5 consecutive days to recall distinguishing carvone $^+$ and carvone $^-$. Mice were then retested in the simple carvone discrimination task at 30 d (t30) following the end of the training session (t0). CORT-treated animals exhibited a memory deficit that was attenuated by FLX. Values are plotted as mean ± SEM ($n = 8$ for vehicle and CORT-treated; $n = 35$ for CORT + FLX). $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$.

Table 1. Detailed information on the primary antibodies used in this study

Antibody	Manufacturer	Marker	Working dilutions
BrdU	Abcys, ABC 117-7513	Proliferating cells	1:1000
DCX	Abcam, ab 18723	Neuroblasts	0.5 μg/ml
GFP	Molecular Probes	LV-CMV-GFP	1:1000
Ki67	Abcam, ab16667	Proliferating cells	1:500
NeuN	Millipore Bioscience Research Reagents,	Neurons	5 μg/ml
OMP	MAB377	Olfactory sensory neurons	1:2000
	Wako, 544-10001		

delineated and DCX^+ and $BrdU^+$ cells were counted manually using the plugin "Manual counting" (http://icy.bioimageanalysis.org/plugin/manual_counting). Regions-of-interest were designed with the ring plugin (http://icy.bioimageanalysis.org/plugin/Ring ROI). Values are expressed as the mean of total DCX^+ or $BrdU^+$ cell count in six OB slices per animal.

For the quantification of DCX immunoreactivity (IR) in the SVZ and olfactory marker protein (OMP) IR in glomeruli of the OB, pixel density was computed using the plugin "Thresholded pixel density." This plugin computes the number of pixels over a threshold in a given region of interest over the total number of pixels present in the region of interest (http://icy.bioimageanalysis.org/plugin/Thresholded_pixel_density). For OMP

IR, six glomeruli of the dorsomedial part of OB coronal sections were selected and assessed for each animal. The batch mode of this analysis is available as a protocol [http://icy.bioimageanalysis.org/protocol/Pix- el-_density_(batch_mode)]. All the codes and implementation of these programs are available online. For the quantification of Ki67$^+$ cells in the OE, serial sections of the olfactory mucosa situated through the anterior end of the OB were analyzed blindly. Four to six serial sections were chosen per animal (5 animals analyzed per group, 6–7 zones analyzed per OE section).

For hippocampal analysis, values are expressed as the mean total number of DCX$^+$ or BrdU$^+$ cells counted manually in 8 DG sections per animal. For BrdU and neuronal nuclei (NeuN) double-staining analysis, positive cells were counted in the GCL (6 slices per animal, 4 mice analyzed per group, 80–120 BrdU$^+$ cells analyzed) and in the DG (8 slices per animal, 4 mice analyzed per group, 20–30 BrdU$^+$ cells analyzed). Data are expressed as the number of double-labeled cells in the GCL and DG.

For the analysis of dendritic morphology of adult newborn OB neurons, 8 coronal sections of a 180 μm distance were selected, taking the accessory OB as a landmark. Fifteen neurons (located $\geq$40 μm in the GCL) were selected for each animal. These neurons were imaged using a confocal microscope (Zeiss LSM 700, 25× objective, 0.5–1 numerical zoom). The dendritic tree was manually traced using the Filament tracer module of the Imaris Bitplane software v7.6. Total dendritic length, number of branches and Sholl data were collected. For Sholl analysis, virtual concentric circles were traced at every micrometer starting from the beginning of the dendrite, and the number of intersections between the dendritic tree and each circle were counted as previously described (Pallotto et al., 2012). For the analysis of dendritic morphology of hippocampal adult-born neurons, the maturation index was calculated as previously described (Mendez-David et al., 2014). DCX$^+$ cells were subcategorized according to their dendritic morphology as DCX$^+$ cells without and DCX$^+$ cells with tertiary (or higher order) dendrites. The maturation index was defined as the ratio of DCX$^+$ cells possessing tertiary dendrites to the total number of DCX$^+$ cells.

Statistical analysis

All data were expressed as mean ± SEM. Statistical analyses were performed using the Prism software (GraphPad v6), with $p < 0.05$ considered statistically significant. Data were analyzed using unpaired two-tailed Student's *t* test, one-way ANOVA or two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test or Mantel-Cox log-rank test when appropriate.

Results

Chronic CORT treatment induces anxiety- and depression-like states in mice

Using standard tests for anxiety and depression, we confirmed that chronic treatment with CORT triggers an anxiety/depression-like phenotype that is responsive to chronic FLX treatment. At 4 weeks of treatment, CORT decreased the time spent in the center of the open field (185 ± 12 s vs 333 ± 43 s, $t = 4.53$, $p < 0.001$, unpaired *t* test; Fig. 1*A*), and in the open arms of the elevated plus maze (39 ± 3 s vs 58 ± 11 s, $t = 2.19$, $p = 0.03$, unpaired *t* test; Fig. 1*B*). In the novelty suppressed feeding test, CORT significantly increased feeding latency (359 ± 23 s vs 97 ± 12 s, $p < 0.001$, Kaplan–Meier survival analysis, Mantel-Cox log-rank test; Fig. 1*C*) without affecting feeding drive (Fig. 1*D*), whereas in the splash test CORT increased grooming latency (207 ± 17 s vs 55 ± 12 s, $p < 0.001$, Kaplan–Meier survival analysis, Mantel-Cox log-rank test; Fig. 1*E*) and decreased grooming frequency (2 ± 0.2 vs 5 ± 0.8, $t = 4.78$, $p < 0.001$, unpaired *t* test; Fig. 1*F*).

At 16–17 weeks of CORT treatment (Fig. 2*A*), feeding latency in the novelty suppressed test remained significantly increased (470 ± 52 s vs 80 ± 15 s, $p < 0.001$, Kaplan–Meier survival analysis, Mantel-Cox log-rank test; Fig. 2*B*) without changes in feeding drive (vehicle: 0.29 ± 0.05; CORT: 0.25 ± 0.06; CORT+FLX: 0.23 ± 0.07; $F_{(2,44)} = 0.19$, $p = 0.1$, one-way ANOVA, Bonferroni *post hoc* test; Fig. 2*C*). Moreover, changes in grooming behavior persisted, namely decreased grooming frequency (3 ± 0.3 vs 6 ± 0.7; $F_{(2,44)} = 7.09$, $p = 0.03$, one-way ANOVA, Bonferroni *post hoc* test; Fig. 2*D*) and increased latency to groom (116 ± 18 s vs 29 ± 7 s, $p < 0.001$; Kaplan–Meier survival analysis, Mantel-Cox log-rank test; Fig. 2*E*). CORT also increased immobility in the forced swim test (119 ± 18 s vs 230 ± 37 s; $F_{(2,44)} = 4.13$, $p = 0.02$, one-way ANOVA, Bonferroni *post hoc* test; Fig. 2*F*) and in the tail suspension test, albeit in a nonsignificant manner (Fig. 2*G*). Chronic FLX exerted antidepressant effects that were mainly prominent in the novelty suppressed feeding and splash tests. More specifically, FLX restored feeding latency (176 ± 34 s, $p < 0.001$ vs CORT, one-way ANOVA, Bonferroni *post hoc* test), as well as grooming frequency (6 ± 0.5, $p = 0.002$ vs CORT, one-way ANOVA, Bonferroni *post hoc* test) and latency to groom (27 ± 4 s, $p < 0.001$ vs CORT, Kaplan–Meier survival analysis, Mantel-Cox log-rank test; Fig. 2*B*,*D*,*E*). When administered alone for 10–11 weeks (Fig. 3*A*), chronic FLX generated some anxiety-related behaviors in otherwise naive mice, reflected mainly by an increase in feeding latency in the novelty suppressed feeding test (vehicle: 81 ± 13 s; FLX: 212 ± 42 s, $t = 3.3$, $p = 0.005$, unpaired *t* test; Fig. 3*B*). Together, these data indicate that chronic CORT exposure induces an anxiety/depression-like state in mice that is reversed by prolonged coadministration of FLX.

Olfactory discrimination is impaired by chronic CORT and not restored by FLX

To test whether the observed anxiety/depression-like state was accompanied by olfactory deficits, we first evaluated olfactory discrimination by using an automated operant conditioning procedure (a go/no-go test; Fig. 4*A*). Mice were trained to recognize IAA as the stimulus rewarded with water (S$^+$) and MO as the non-rewarded stimulus (S$^-$; Fig. 4*B*). In the next step, mice were trained to distinguish between two carvone enantiomers diluted in MO; carvone$^+$ (S$^+$) and carvone$^-$ (S$^-$); and we then assessed fine olfactory discrimination using binary mixtures of the same carvone enantiomers (Fig. 4*C*). We observed that CORT and CORT+FLX did not affect acquisition and success rates in the simple discrimination task of IAA versus MO and in the carvone enantiomer task (Fig. 4*B*,*C*). However, in the "difficult" mixture discrimination task, the performance of CORT-treated animals was significantly poorer compared with controls and was not restored by FLX (two-way repeated mesures ANOVA, 8/2 mixture ratio task: treatment factor $F_{(2,44)} = 5.04$, $p = 0.01$; 6/4 mixture ratio task: treatment factor $F_{(2.44)} = 5.43$, $p = 0.01$; Fig. 4*C*).

Olfactory acuity is impaired by chronic CORT and restored by FLX

Mice were trained to detect successively descending decimal concentrations of *N*-butanol (S$^+$) diluted in water (S$^-$), starting with a concentration of 0.01%. CORT decreased the detection threshold by two orders of magnitude (Fig. 4*D*; mean odorant dilution (−log); vehicle: 8.2 ± 0.4; CORT: 6.5 ± 0.3; $F_{(2.44)} = 4.23$, $p = 0.02$, one-way ANOVA, Bonferroni *post hoc* test). Cotreatment with FLX attenuated the CORT-induced deficit (Fig. 4*D*; mean odorant dilution (−log); 7.7 ± 0.3, $p = 0.03$, one-way ANOVA, Bonferroni *post hoc* test).

Olfactory memory is affected by chronic CORT and improved by FLX

We assessed long-term olfactory memory by using the same pair of carvone isoforms (Fig. 4*E*). Thirty days following task consolidation, the ability of mice to recognize carvone$^+$ and carvone$^-$ enantiomers was re-evaluated, using one block of 20 trials that was devoid of water reward. Four weeks following task consolidation, the performance of CORT-treated mice was near chance level, revealing that chronic CORT impaired olfactory memory [mean correct response; vehicle: 72.5%; CORT: 50.6%; $p = 0.002$, two-way ANOVA; $F_{(2.44)}$ (treatment × memory) = 7.22]. Treatment with FLX was able to improve performance (mean correct response; 61.3%, $p < 0.05$ compared with CORT).

Olfaction is impaired by chronic FLX

Although FLX restored most CORT-induced olfactory deficits, it significantly impaired olfaction when administered alone chronically (Fig. 3*C–F*). FLX induced a substantial decrease in olfactory acuity [mean odorant dilution (−log); vehicle: 6.5 ± 0.2; CORT: 4.1 ± 0.8; $t = 3.28$, df = 16, $p = 0.003$, unpaired *t* test; Fig. 3*C*]. Fine discrimination was also affected (Fig. 3*D*,*E*), and this effect was most prominent in the 6/4 versus 4/6 carvone mixture task (two-way ANOVA; $F_{(1,16)}$ treatment = 8.59, $p = 0.01$; Fig. 3*E*). Long-term olfactory memory was also significantly impaired by FLX (two-way ANOVA; $F_{(1,32)}$ interaction = 16.45, $p = 0.003$; Fig. 3*F*).

Adult neurogenesis is impaired by chronic CORT and restored by chronic FLX

We then investigated whether adult neurogenesis was affected by CORT. We measured the production of new neurons in the SVZ and DG and their survival rate in the OB and DG. Quantitative analysis of the population of adult-born neurons at 20 weeks of CORT and 14 weeks of CORT+FLX treatment showed a significant twofold decrease in the number of DCX$^+$ neurons in the DG that was reversed by FLX (mean cell number; vehicle: 4782 ± 115; CORT: 1879 ± 286; CORT+FLX: 7439 ± 910 cells; $F_{(2.18)} = 7.06$; CORT vs vehicle: $p = 0.04$; CORT vs CORT+FLX: $p = 0.002$; one-way ANOVA, Bonferroni *post hoc* test; Fig. 5*A*,*D*). On the other hand, neither CORT nor CORT+FLX altered the number of DCX$^+$ in the SVZ (Fig. 5*B*,*F*). These results indicate that CORT affects differentially the two stem cell niches of the adult brain, reducing neural production in the DG but sparing SVZ neurogenesis. Yet, we found that the number of DCX$^+$ neurons in the core of the OB, the RMSob, was decreased in the CORT group, and this effect was reversed by FLX (vehicle: 15,834 ± 1049; CORT: 10,316 ± 310; CORT+FLX: 15,590 ± 1332 cells; $F_{(2.18)} = 5.78$; CORT vs vehicle: $p = 0.04$; CORT vs CORT+FLX: $p = 0.03$, one-way ANOVA, Bonferroni *post hoc* test; Fig. 5*C*,*H*). Moreover, the number of DCX$^+$ cells was notably reduced by CORT and restored by FLX in the GCL (vehicle: 29,292 ± 1159; CORT: 15,876 ± 355; CORT+FLX: 29,545 ± 4557 cells; $F_{(2.18)} = 4.02$; CORT vs vehicle: $p = 0.05$; CORT vs CORT+FLX: $p = 0.05$, one-way ANOVA, Bonferroni *post hoc* test; Fig. 5*C*,*G*) and in the GL (vehicle: 2491 ± 64; CORT: 1387 ± 158; CORT+FLX: 2476 ± 282; $F_{(2.18)} = 5.72$; CORT vs vehicle: $p = 0.04$; CORT vs CORT+FLX: $p = 0.03$, one-way ANOVA, Bonferroni *post hoc* test; Fig. 5*I*). Therefore, it is likely that CORT affects olfactory adult neurogenesis by altering neuronal survival in the OB, while leaving intact cell production in the SVZ.

To address this question more directly, we examined both cell proliferation and survival in the DG and OB, by measuring BrdU$^+$ cells 2 h and 1 month following BrdU injection, respectively (Fig. 6*A*). BrdU$^+$ cell counting confirmed that CORT significantly decreases cell proliferation in the DG, whereas FLX completely restores it (mean BrdU$^+$ cell number; vehicle: 723 ± 60; CORT: 414 ± 58; CORT+FLX: 985 ± 126 cells; $F_{(2.18)} = 5.76$; CORT vs vehicle: $p = 0.05$; CORT vs CORT+FLX: $p = 0.02$, one-way ANOVA, Bonferroni *post hoc* test; Fig. 6*B*,*F*). However, neither CORT nor CORT+FLX altered the number of BrdU$^+$ in the SVZ (Fig. 6*G*).

Moreover, CORT induced a twofold decrease in the survival of newborn cells in the DG (BrdU$^+$ cell number; vehicle: 361 ± 30; CORT: 207 ± 29; $F_{(2.18)} = 0.58$, $p = 0.02$, one-way ANOVA, Bonferroni *post hoc* test; Fig. 6*H*). FLX reversed this effect albeit in a nonsignificant manner. Likewise, cell survival was reduced by CORT in the OB, both in the GL (BrdU$^+$ cell number; vehicle: 997 ± 123 cells; CORT: 523 ± 60 cells; $F_{(2.18)} = 1.17$, $p = 0.05$, one-way ANOVA, Bonferroni *post hoc* test; Fig. 6*I*) and the GCL (BrdU$^+$ cell number; vehicle: 9082 ± 1212 cells; CORT: 4978 ± 475 cells; $F_{(2.18)} = 4.91$, $p = 0.02$, one-way ANOVA, Bonferroni *post hoc* test; Fig. 6*J*). FLX reversed this effect mainly in the GL (BrdU$^+$ cell number, 985 ± 101 cells, $p = 0.03$ vs CORT; one-way ANOVA, Bonferroni *post hoc* test). Finally, BrdU and NeuN colabeling showed that the vast majority of BrdU$^+$ cells were also colabeled with the neuronal biomarker NeuN in all treatment groups tested (Fig. 6*E*,*K*). In the GCL of OB, analysis of 80–120 cells per animal ($n = 4$ mice) in the vehicle group showed that ~90% BrdU+ cells coexpressed NeuN and thus had a neuronal phenotype. We found that the percentage of BrdU$^+$ cells labeled with NeuN was not modified by CORT and CORT+FLX treatment (Fig. 6*K*; vehicle: 92.5 ± 1.5%; CORT: 92.8 ± 0.9%; CORT+FLX: 91.1 ± 0.6%). Moreover, we found no group difference in BrdU/NeuN double staining in the DG (20–30 cells per animal; vehicle: 91.1 ± 0.5%; CORT: 87.7 ± 3.1%; CORT+FLX: 91.8 ± 0.7%). Together, these data indicate that chronic CORT exposure affects both adult hippocampal and olfactory neurogenesis and that chronic FLX can stimulate the recruitment and/or survival of newborn neurons within the DG and OB.

Chronic CORT treatment does not alter adult neurogenesis in the olfactory epithelium

Given the prominent effects of CORT on olfactory function, we checked whether the olfactory sensory organ could be impaired. Olfactory sensory neurons located in the OE project via the olfactory nerve to glomeruli in the GL of the OB, where they synapse on the dendrites of output mitral/tufted cells. Olfactory sensory neurons are continually replaced throughout life by the progeny of dividing basal cells located in the OE. We quantified the level of cell proliferation in the OE by counting the number of Ki67$^+$ cells in this zone. Anti-Ki67 immunostaining is mainly localized in the basal area of the normal OE (Fig. 7*A*,*B*). We found no difference in the distribution and the number of Ki67$^+$ cells between vehicle and CORT-treated mice following 4 weeks of treatment [mean number of Ki67$^+$ cells (10^4) per mm^3; vehicle: 8.09 ± 0.23; CORT: 8.55 ± 0.65, unpaired *t* test; Fig. 7*C*]. Staining for OMP, a cell marker specific of mature olfactory sensory neurons, was quantified in the GL (Fig. 7*E*). We found no difference in the distribution and intensity of OMP between vehicle, CORT and CORT+FLX-treated mice (mean IR within glomeruli; vehicle: 0.1498 ± 0.02; CORT: 0.1803 ± 0.01; CORT+FLX: 0.1503 ± 0.01; one-way ANOVA, Bonferroni *post hoc* test; Fig. 7*F*). These results indicate that cell proliferation in the OE and the degree of sensory innervation in the OB are both insensitive to chronic CORT treatment.

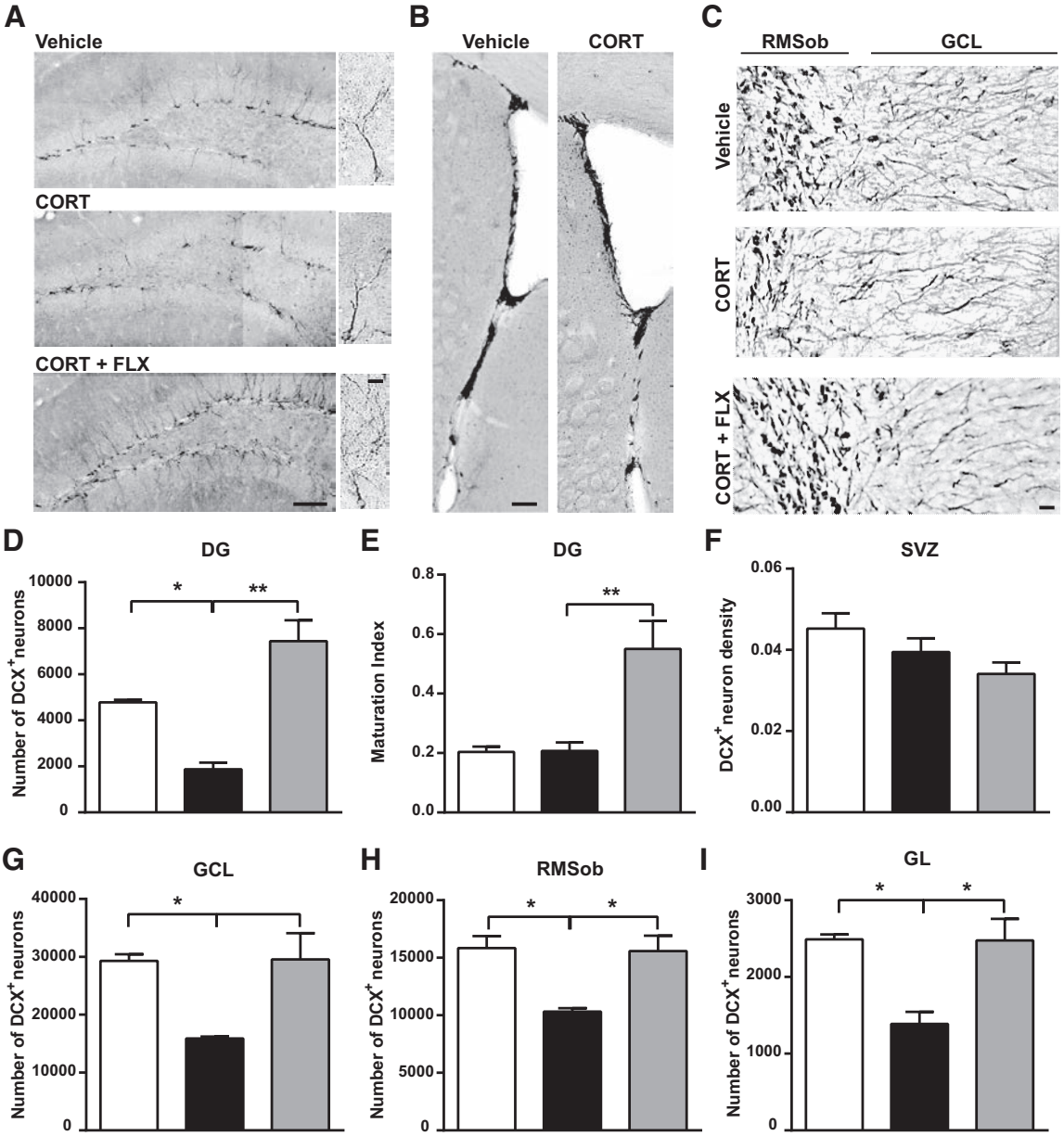


Figure 5. Neuronal turnover in the OB and DG is decreased by chronic CORT and restored by FLX. ***A***, Representative images showing DCX$^+$ cells in the DG of the hippocampus. Scale bars: 100 and 10 μm. ***B***, Representative images of DCX$^+$ cells in the SVZ (scale bar, 100 μm) and (***C***) the RMSob and the GCL of the OB (scale bar, 15 μm). Quantitative evaluation of the effects of CORT and CORT+FLX on the number of DCX$^+$ cells in the (***D***) DG, (***F***) SVZ, (***G***) GCL of the OB, (***H***) RMSob, and (***I***) GL layer of the OB. ***E***, Maturation index of newborn DG granule cells following CORT and CORT+FLX treatments. The maturation index is calculated as the ratio of DCX$^+$ cells with tertiary (or higher order) dendrites to the total number of DCX$^+$ cells. Values are plotted as mean ± SEM ($n = 5$ for vehicle and CORT-treated; $n = 10$ for CORT+FLX). *$p < 0.05$, **$p < 0.01$. RMSob, Rostral migratory stream of the olfactory bulb.

Impact of CORT and FLX on the morphology of newborn interneurons

Dendritic complexity of adult-born DG neurons increases during the first month following neuronal birth, a stage during which cells express the DCX marker. To further examine the effects of CORT on dendritic morphology of newborn neurons, we characterized DCX$^+$ cells in the DG according to the number of dendrites, and calculated the maturation index as the ratio of DCX$^+$ cells with tertiary (or higher order) dendrites to the total number of DCX$^+$ cells. Although we found no effect of chronic CORT on the maturation index of adult-born DG neuroblasts, we observed a significant threefold increase induced by CORT+FLX (mean maturation index; vehicle: 0.20 ± 0.02; CORT: 0.21 ± 0.03; CORT+FLX: 0.55 ± 0.09; $F_{(2.12)} = 0.89$; CORT vs CORT + FLX: $p = 0.007$, one-way ANOVA, Bonferonni *post hoc* test; Fig. 5E).

DCX is also expressed by adult-born OB interneurons for <10 d after birth but cannot be used for the assessment of dendrite complexity due to the large staining in the OB. Thus, to assess the impact of chronic CORT and FLX on the maturation of newborn OB interneurons, a lentiviral vector expressing the GFP was injected into the RMS following 8 weeks of CORT and 4 weeks of CORT+FLX or FLX alone (Fig. 8*A*,*C*). Three weeks after injection, we analyzed the apical dendritic tree of GFP$^+$ adult-born granule cells in the OB and found that chronic CORT did not alter the number of dendrites (Fig. 8*D*) nor total dendritic length (Fig. 8*E*). However, CORT+FLX and FLX alone increased both the number of dendrites (vehicle: 4.93 ± 0.29; CORT: 4.92 ±

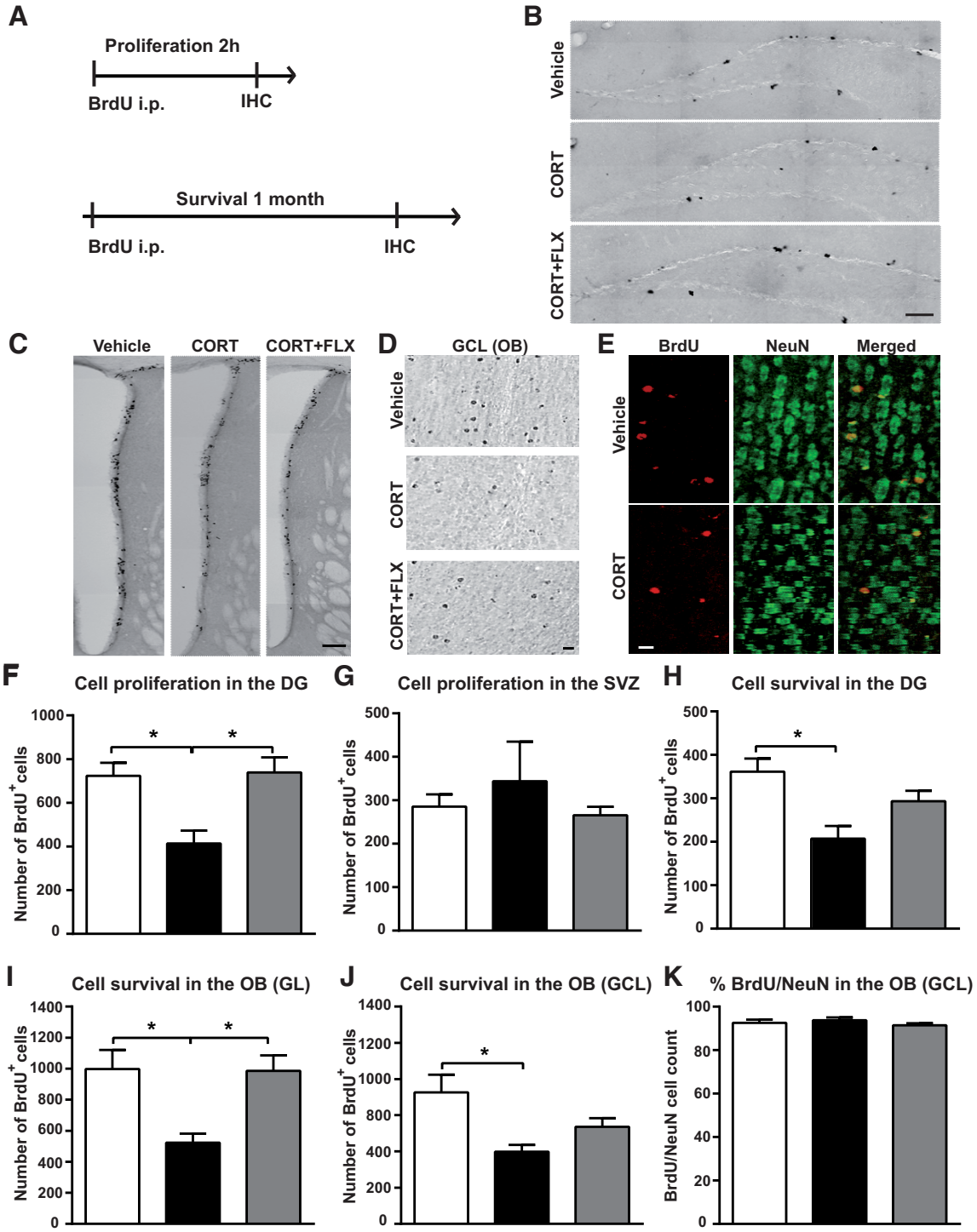


Figure 6. Adult-born neuron proliferation and survival is decreased by chronic CORT and restored by FLX. ***A***, Diagram depicting BrdU injection protocols for the evaluation of cell proliferation and survival. ***B***, ***C***, Representative coronal images of BrdU$^+$ cells in (***B***) the DG of the hippocampus (scale bar, 100 μm), and (***C***) the SVZ (scale bar, 100 μm) 2 h following BrdU administration. ***D***, Representative images showing BrdU$^+$ cells in the GCL of the OB of vehicle, CORT and CORT+FLX-treated mice, one month after BrdU administration. Scale bar, 15 μm. ***E***, BrdU (red) and NeuN (green) colabeled cells in the GCL of vehicle and CORT-treated mice, one month after BrdU administration. Scale bar, 15 μm. ***F***, ***G***, Graphs depicting the effects of CORT and CORT+FLX on cell proliferation in (***F***) the DG and (***H***) the SVZ (n = 5–10/group). ***H***–***J***, Graphs showing the effect of CORT and CORT+FLX on cell survival in (***H***) the DG, (***I***) the GL of the OB a,nd (***J***) the GCL of the OB (n = 5–10/group). ***K***, Graph showing the percentage of BrdU$^+$ cells labeled with NeuN in the GCL of vehicle, CORT and CORT+FLX-treated mice 1 month following BrdU administration (n = 4–5 animals per group, 80–120 cells analyzed per group). Values are plotted as mean ± SEM. *$p < 0.05$.

0.25; CORT+FLX: 5.66 ± 0.36; FLX: 5.84 ± 0.34; $F_{(3.16)} = 0.46$; vehicle vs FLX: $p = 0.05$; one-way ANOVA, Bonferroni *post hoc* test) and dendritic length (vehicle: 559.8 ± 28.2 μm; CORT: 586.4 ± 24.3; CORT+FLX: 714.7 ± 24.3; FLX: 659.8 ± 25.7; $F_{(3.16)} = 6.76$; vehicle vs CORT+FLX: $p = 0.001$; vehicle vs FLX: $p = 0.05$; CORT vs CORT+FLX: $p = 0.01$; one-way ANOVA, Bonferroni *post hoc* test; Fig. 8*D*,*E*). Sholl analysis revealed that the most significant changes in the number of branches were obtained by CORT+FLX, suggesting a cumulative effect of the two treatments (two-way ANOVA; $F_{(3,155)} = 7.36$, $p < 0.001$; Fig. 8*F*). Finally, we observed no effect of CORT and FLX on spine density and length (data not shown). Together, these results sug-

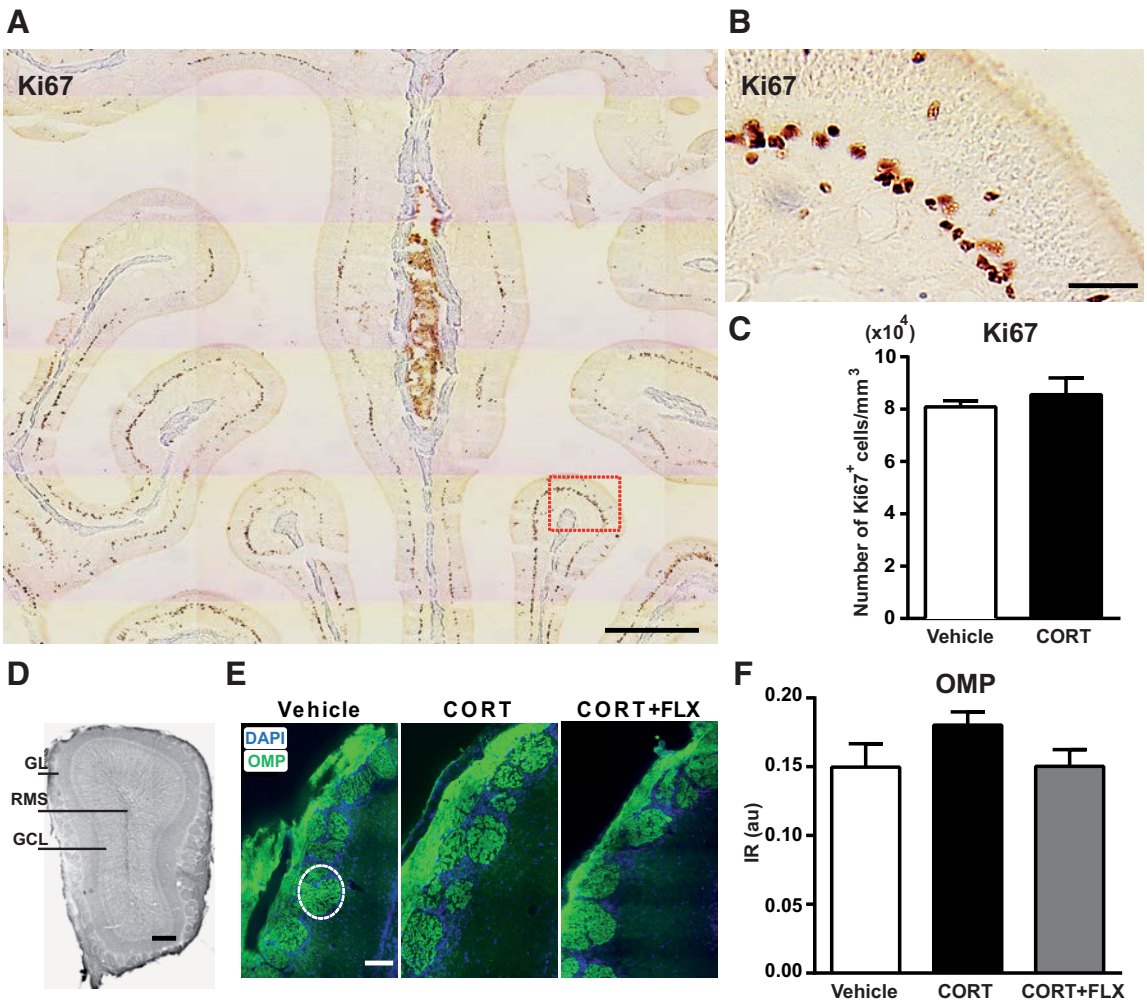


Figure 7. Chronic CORT treatment does not affect sensory afferentation to the OB. ***A***, ***B***, Immunostaining with the Ki67 antibody in a normal 8-week-old mouse olfactory mucosa. ***B***, A magnification of the region delineated by a red rectangle in ***A***. Scale bars: ***A***, 500 μm; ***B***, 50 μm. ***C***, Four weeks of CORT administration did not change the number of Ki67$^+$ cells in the OE ($n = 5$ mice per group). ***D***, OB coronal section of a vehicle-treated mouse, Scale bar, 100 μm. ***E***, Representative images of OMP (green) and DAPI (blue) staining in the GL following 20 weeks of CORT and 14 weeks of CORT + FLX treatment. Scale bar, 50 μm. The dotted line delineates one glomerulus. ***F***, CORT and CORT + FLX had no effect on OMP IR in the OB (values are plotted as mean ± SEM, $n =$ 4 mice per group; 6 glomeruli in the dorsomedial GL analyzed per animal). au, Arbitrary units.

gest that FLX, but not CORT, facilitates the maturation of newborn neurons in both the adult hippocampus and OB circuits.

Discussion

This study reports that a mouse model that mimics states of HPA axis hyperactivity, a common trait of MDD, is associated with impaired adult neurogenesis and pronounced olfactory deficits, including acuity, discrimination, and memory. We found that prolonged antidepressant treatment with fluoxetine not only restored adult neurogenesis and mood, but also improved most olfactory functions. Our data identify a key role for the HPA axis in olfactory impairments associated with anxiety/depressive states.

Deleterious impact of chronic CORT on adult neurogenesis and olfaction

Our present findings demonstrate that the CORT model not only evokes a persistent fear-related response inhibition, reminiscent of anxiety/depression-like states, but also induces olfactory dysfunction. Importantly, similar olfactory deficits affecting odorant detection and discrimination have been reported in MDDs (Pause et al., 2001; Negoias et al., 2010). In turn, perturbations of the olfactory circuit and function can induce anxiety and depression-like behaviors in rodents (Glinka et al., 2012; Lazarini et al., 2012). Thus, we cannot rule out the possibility that CORT-induced olfactory deficits could be in part responsible for the mood states observed in this model. For instance, olfactory bulbectomy constitutes a model of depression and is used as a predictor of antidepressant drug response in rodents (Wren et al., 1977). Although the precise mechanisms remain elusive, it can be speculated that such sensory deficits likely affect the function of neural circuits involved in the control of mood and emotions.

Interestingly, we also found that chronic CORT significantly reduces neurogenesis in the OB. The number of new OB interneurons was decreased twofold following CORT treatment in all OB layers. This decrease could partly explain the CORT-induced olfactory deficits, because adult-born OB interneurons take part in odorant detection, discrimination, olfactory learning, and memory (Breton-Provencher et al., 2009; Moreno et al., 2009; Mouret et al., 2009; Belnoue et al., 2011; Lazarini et al., 2011; Alonso et al., 2012; Sakamoto et al., 2014). However, it is important to note that in humans, MDD-related hyposmia is unlikely to be due to reduced neurogenesis in the OB, as cells

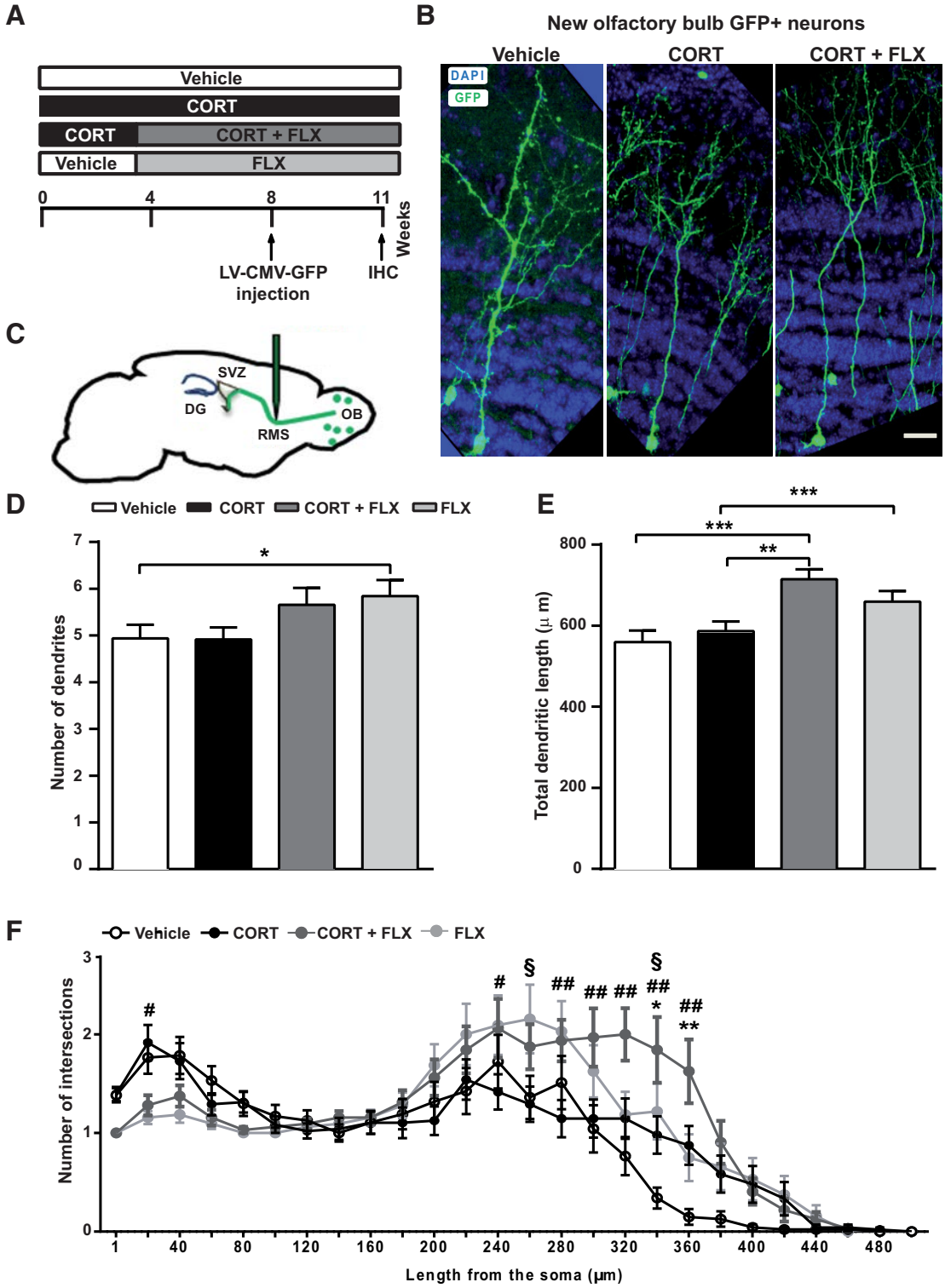


Figure 8. Dendritic length and complexity are increased by chronic CORT and FLX treatments. ***A***, Experimental timeline of viral injections and analysis. ***B***, Confocal images of vehicle, CORT, and CORT+FLX-treated OB slices showing GFP $^{+}$ neurons and DAPI staining. Scale bar, 20 μm. ***C***, Lentiviral vectors encoding GFP under the control of the CMV promotor were injected in the RMS. ***D***, FLX treatment alone increased the number of dendrites in newborn OB neurons. ***E***, CORT+FLX and FLX treatments significantly increased dendritic length. ***F***, Graph depicting the effect of chronic CORT, CORT+FLX and FLX treatments on the number of dendritic branches, according to Sholl analysis. CORT+FLX treatment increased the number of branches. Values are plotted as mean ± SEM (n = 4/group). *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ in CORT versus vehicle; #$p < 0.05$, ##$p < 0.01$ in CORT versus CORT+FLX; §$p < 0.05$ in vehicle versus FLX.

born in the adult SVZ are mostly directed to the striatum and not to the OB (Ernst et al., 2014). Moreover, one cannot rule out the possibility that the CORT-induced hyposmia revealed in this study could be partly linked to a deleterious effect of CORT on preexisting granule and periglomerular cells in the OB. This could also be the case in human patients suffering from MDD. Finally, because glucocorticoid receptors are widely distributed in the OB and olfactory cortex, as in other limbic areas, notably the hippocampus, amygdala, and hypothalamus (Morimoto et al., 1996), it is possible that CORT-induced changes in overall

cortical and limbic processing could be linked to the observed olfactory deficits.

Our results also showed that chronic CORT impairs both proliferation and survival of progenitor cells in the DG, demonstrating a role for glucocorticoids in several steps of the neurogenic process. Our data are in line with previous work reporting that ablation of the adrenal glands abolishes the stress-induced decrease in cell proliferation in the DG (Tanapat et al., 2001). Although CORT reduced cell proliferation in the DG, it did not affect cell proliferation in the OE nor the number of newly generated immature neurons expressing DCX in the SVZ. Our results indicate that the early steps of adult neurogenesis are differentially regulated by CORT in the DG, EO, and SVZ. However, given the decrease in the population of adult-born neurons in the OB, it is possible that CORT treatment alters the survival rate of adult-born OB neurons. Interestingly, their dendritic morphology was not changed by CORT, suggesting that the surviving neurons are functionally integrated in the OB circuit. This hypothesis is also supported by the fact that the distribution and degree of the sensory afferents reaching the OB, was unchanged. Concerning the adult olfactory system, the functional importance of CORT remains largely unknown. New experiments aiming to assess firing activity, dendritic dynamics, and innate responses to odorants are needed to decipher the precise role of CORT in olfactory processing and odor-driven behaviors.

Chronic FLX treatment attenuates CORT-induced olfactory deficits and restores adult neurogenesis

Our findings show that the antidepressant FLX can restore olfactory acuity and memory in CORT-treated mice. Interestingly, we also showed that FLX restores olfactory neurogenesis and facilitates the maturation of adult-born neurons in the OB and hippocampus. This proneurogenic effect could partly support the FLX-induced restoration of olfactory deficits. Similarly, recruitment of newborn neurons was recently reported to selectively restore circuits in the lesioned OB and resume olfaction (Lazarini et al., 2014).

FLX restored both proliferation and survival of progenitor cells in the DG, as previously reported (David et al., 2009; Rainer et al., 2012; Guilloux et al., 2013). By restoring hippocampal neurogenesis, FLX probably helps reestablish HPA axis function, resulting in functional improvement. In fact, it is argued that newly generated neurons may facilitate a dysfunctional hippocampus to restore control on stress response systems, and that the ability of FLX to restore hippocampal regulation of the HPA axis under chronic stress occurs only in the presence of an intact neurogenic niche. Further experiments aiming to selectively block either DG or SVZ neurogenesis in our model are required to disambiguate the role of each site of adult neurogenesis in the response to FLX and their associated behavioral rehabilitation.

Finally, to explain the olfactory deficits induced by FLX alone, one should keep in mind that the OB is one of the most densely innervated serotonergic targets of the raphe nuclei, and fibers from the latter are the densest centrifugal projections in the OB (Dugué and Mainen, 2009). Serotonin alters synaptic transmission and information processing in the glomerular layer of the OB, where the density of serotonergic fibers from the raphe nuclei is maximal. As it has been indicated by early experiments, local application of serotonin receptor agonists attenuates odor-evoked olfactory neuron activity (Bloom et al., 1964), whereas serotonin receptor antagonists boost glomerular activation, showing that endogenous serotonin suppresses odor input (Petzold et al., 2009). These previous studies could explain the deficits in olfactory acuity, discrimination, and long-term memory obtained by chronic FLX treatment.

Together, our findings introduce novel effects of chronic CORT and FLX on olfaction and olfactory neurogenesis in the mouse. These observations bring further insights on the poorly known biological underpinnings of anxiodepressive states and help move toward more effective therapeutic ends targeting neurogenesis, as well as useful diagnostic tools based on olfaction.

References

Alonso M, Lepousez G, Sebastien W, Bardy C, Gabellec MM, Torquet N, Lledo PM (2012) Activation of adult-born neurons facilitates learning and memory. Nat Neurosci 15:897–904. CrossRef Medline

Anacker C, Zunszain PA, Carvalho LA, Pariante CM (2011) The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? Psychoneuroendocrinology 36:415–425. CrossRef Medline

Belnoue L, Grosjean N, Abrous DN, Koehl M (2011) A critical time window for the recruitment of bulbar newborn neurons by olfactory discrimination learning. J Neurosci 31:1010–1016. CrossRef Medline

Bloom FE, Costa E, Salmoiraghi GC (1964) Analysis of individual rabbit olfactory bulb neuron responses to the microelectrophoresis of acetylcholine, norepinephrine and serotonin synergists and antagonists. J Pharmacol Exp Ther 146:16–23. Medline

Boldrini M, Underwood MD, Hen R, Rosoklija GB, Dwork AJ, John Mann J, Arango V (2009) Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. Neuropsychopharmacology 34:2376–2389. CrossRef Medline

Breton-Provencher V, Lemasson M, Peralta MR 3rd, Saghatelyan A (2009) Interneurons produced in adulthood are required for the normal functioning of the olfactory bulb network and for the execution of selected olfactory behaviors. J Neurosci 29:15245–15257. CrossRef Medline

Campbell S, Marriott M, Nahmias C, MacQueen GM (2004) Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. Am J Psychiatry 161:598–607. CrossRef Medline

Chen H, Pandey GN, Dwivedi Y (2006) Hippocampal cell proliferation regulation by repeated stress and antidepressants. Neuroreport 17:863–867. CrossRef Medline

Croy I, Negoias S, Symmank A, Schellong J, Joraschky P, Hummel T (2013) Reduced olfactory bulb volume in adults with a history of childhood maltreatment.Chem Senses 38:679–684. CrossRef

Cryan JF, Mombereau C, Vassout A (2005) The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. Neurosci Biobehav Rev 29:571–625. CrossRef Medline

David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang JW, Marsteller D, Mendez I, Drew M, Craig DA, Guiard BP, Guilloux JP, Artymyshyn RP, Gardier AM, Gerald C, Antonijevic IA, Leonardo ED, Hen R (2009) Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. Neuron 62:479–493. CrossRef Medline

de Chaumont F, Dallongeville S, Chenouard N, Hervé N, Pop S, Provoost T, Meas-Yedid V, Pankajakshan P, Lecomte T, Le Montagner Y, Lagache T, Dufour A, Olivo-Marin JC (2012) Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. Nat Methods 9:690–696. CrossRef Medline

Dranovsky A, Hen R (2006) Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. Biol Psychiatry 59:1136–1143. CrossRef Medline

Dugué GP, Mainen ZF (2009) How serotonin gates olfactory information flow. Nat Neurosci 12:673–675. CrossRef Medline

Ernst A, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Perl S, Tisdale J, Possnert G, Druid H, Frisén J (2014) Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. Cell 156:1072–1083. CrossRef Medline

Garza JC, Guo M, Zhang W, Lu XY (2012) Leptin restores adult hippocampal neurogenesis in a chronic unpredictable stress model of depression and reverses glucocorticoid-induced inhibition of GSK-3β/β-catenin signaling. Mol Psychiatry 17:790–808. CrossRef Medline

Glinka ME, Samuels BA, Diodato A, Teillon J, Feng Mei D, Shykind BM, Hen R, Fleischmann A (2012) Olfactory deficits cause anxiety-like behaviors in mice. J Neurosci 32:6718–6725. CrossRef Medline

Guilloux JP, Mendez-David I, Pehrson A, Guiard BP, Repérant C, Orvoën S, Gardier AM, Hen R, Ebert B, Miller S, Sanchez C, David DJ (2013) An-

tidepressant and anxiolytic potential of the multimodal antidepressant vortioxetine (Lu AA21004) assessed by behavioral and neurogenesis outcomes in mice. Neuropharmacology 73:147–159. CrossRef Medline

Harris BN, Perea-Rodriguez JP, Saltzman W (2011) Acute effects of corticosterone injection on paternal behavior in California mouse (*Peromyscus californicus*) fathers. Horm Behav 60:666–675. CrossRef Medline

Hitoshi S, Maruta N, Higashi M, Kumar A, Kato N, Ikenaka K (2007) Antidepressant drugs reverse the loss of adult neural stem cells following chronic stress. J Neurosci Res 85:3574–3585. CrossRef Medline

Krishnan V, Nestler EJ (2008) The molecular neurobiology of depression. Nature 455:894–902. CrossRef Medline

Lau BW, Yau SY, Lee TM, Ching YP, Tang SW, So KF (2011) Effect of corticosterone and paroxetine on masculine mating behavior: possible involvement of neurogenesis. J Sex Med 8:1390–1403. CrossRef Medline

Lazarini F, Lledo PM (2011) Is adult neurogenesis essential for olfaction? Trends Neurosci 34:20–30. CrossRef Medline

Lazarini F, Gabellec MM, Torquet N, Lledo PM (2012) Early activation of microglia triggers long-lasting impairment of adult neurogenesis in the olfactory bulb. J Neurosci 32:3652–3664. CrossRef Medline

Lazarini F, Gabellec MM, Moigneu C, de Chaumont F, Olivo-Marin JC, Lledo PM (2014) Adult neurogenesis restores dopaminergic neuronal loss in the olfactory bulb.J Neurosci 34:14430–14442. CrossRef

Lehmann ML, Brachman RA, Martinowich K, Schloesser RJ, Herkenham M (2013) Glucocorticoids orchestrate divergent effects on mood through adult neurogenesis. J Neurosci 33:2961–2972. CrossRef Medline

Linster C, Johnson BA, Morse A, Yue E, Leon M (2002) Spontaneous vs reinforced olfactory discriminations. J Neurosci 22:6842–6845. Medline

Lledo PM, Alonso M, Grubb MS (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. Nat Rev Neurosci 7:179–193. CrossRef Medline

Mendez-David I, David DJ, Darcet F, Wu MV, Kerdine-Römer S, Gardier AM, Hen R (2014) Rapid anxiolytic effects of a 5-HT4 receptor agonist are mediated by a neurogenesis-independent mechanism. Neuropsychopharmacology 39:1366–1378. CrossRef Medline

Mirescu C, Gould E (2006) Stress and adult neurogenesis. Hippocampus 16:233–238. CrossRef Medline

Moreno MM, Linster C, Escanilla O, Sacquet J, Didier A, Mandairon N (2009) Olfactory perceptual learning requires adult neurogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 106:17980–17985. CrossRef Medline

Morimoto M, Morita N, Ozawa H, Yokoyama K, Kawata M (1996) Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. Neurosci Res 26:235–269. CrossRef Medline

Mouret A, Lepousez G, Gras J, Gabellec MM, Lledo PM (2009) Turnover of newborn olfactory bulb neurons optimizes olfaction.J Neurosci 29: 12302–12314. CrossRef

Murray F, Smith DW, Hutson PH (2008) Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviors in mice. Eur J Pharmacol 583:115–127. CrossRef Medline

Negoias S, Croy I, Gerber J, Puschmann S, Petrowski K, Joraschky P, Hummel T (2010) Reduced olfactory bulb volume and olfactory sensitivity in patients with acute major depression. Neuroscience 169:415–421. CrossRef Medline

Olivo-Marin JC (2002) Extraction of spots in biological images using multiscale products. Pattern Recognit 35:1986–1996.

Pallotto M, Nissant A, Fritschy JM, Rudolph U, Sassoè-Pognetto M, Panzanelli P, Lledo PM (2012) Early formation of GABAergic synapses governs the development of adult-born neurons in the olfactory bulb. J Neurosci 32:9103–9115. CrossRef Medline

Pause BM, Miranda A, Göder R, Aldenhoff JB, Ferstl R (2001) Reduced olfactory performance in patients with major depression. J Psychiatr Res 35:271–277. CrossRef Medline

Petzold GC, Hagiwara A, Murthy VN (2009) Serotonergic modulation of odor input to the mammalian olfactory bulb. Nat Neurosci 12:784–791. CrossRef Medline

Rainer Q, Xia L, Guilloux JP, Gabriel C, Mocaër E, Hen R, Enhamre E, Gardier AM, David DJ (2012) Beneficial behavioral and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety. Int J Neuropsychopharmacol 15:321–335. CrossRef Medline

Sahay A, Hen R (2007) Adult hippocampal neurogenesis in depression. Nat Neurosci 10:1110–1115. CrossRef Medline

Sakamoto M, Ieki N, Miyoshi G, Mochimaru D, Miyachi H, Imura T, Yamaguchi M, Fishell G, Mori K, Kageyama R, Imayoshi I (2014) Continuous postnatal neurogenesis contributes to formation of the olfactory bulb neural circuits and flexible olfactory associative learning. J Neurosci 34: 5788–5799. CrossRef Medline

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. Science 301:805–809. CrossRef Medline

Selye H (1950) Stress and the general adaptation syndrome. Br Med J 1:1383–1392. CrossRef Medline

Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA (2011) Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behavior. Nature 476:458–461. CrossRef Medline

Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G, Hen R, Belzung C (2008) Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. Biol Psychiatry 64:293–301. CrossRef Medline

Tanapat P, Hastings NB, Rydel TA, Galea LA, Gould E (2001) Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. J Comp Neurol 437:496–504. CrossRef Medline

Wren A, van Riezen H, Rigter H (1977) A new animal model for the prediction of antidepressant activity. Pharmakopsychiatr Neuropsychopharmakol 10:96–100. CrossRef Medline

II.C Résultats non publiés : étude de la neurogenèse adulte chez les souris C3$^{-/-}$

II.C.1 Étude comportementale

Quelques études ont rapporté des anomalies de comportement chez les souris C3$^{-/-}$ [Perez-Alcazar et al., 2014; Shi et al., 2015]. Cependant, aucune étude à notre connaissance ne s'est intéressée au comportement olfactif des souris C3$^{-/-}$, ni à leur réaction à l'inflammation (*sickness behavior*). Nous avons donc exploré particulièrement ces deux paramètres, en réalisant des tests de comportement spontané sur des souris C3$^{-/-}$ et des souris contrôles immunocompétentes traitées ou non par le LPS bactérien.

II.C.1.a Souris C3$^{-/-}$ adultes : moins anxieuses, plus sensibles au LPS que les contrôles immunocompétents

Nous avons réalisé une batterie de tests de comportement pour évaluer la réponse des souris C3$^{-/-}$ au LPS sur le plan de l'olfaction et du *sickness behavior* (Figure II.1, et partie I.E.4 pour l'explication des tests). Cette étude a été ralentie par des problèmes d'obtention des souris C3$^{-/-}$: l'analyse statistique du comportement spontané nécessite en effet un grand nombre de souris par groupe (10 à 15 idéalement). Les souris C3$^{-/-}$ sont élevées à l'animalerie de l'Institut Pasteur, et nous n'avons jamais 20 à 30 souris C3$^{-/-}$ du même âge (à séparer en deux groupes selon le traitement), d'où des tests effectués sur plusieurs lots de souris ayant chacun un petit effectif.

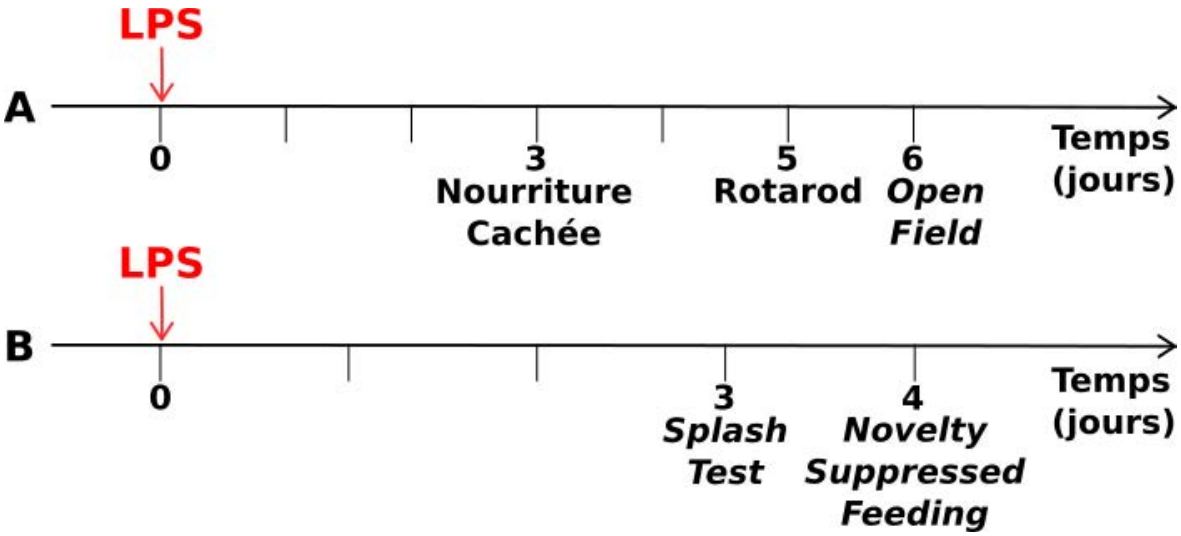


FIGURE II.1 – Décours temporel des expériences de comportement sur les souris C3$^{-/-}$. (A) et (B) présentent le décours des expériences de comportement réalisées sur des groupes distincts de souris C3$^{-/-}$ et contrôles. Au jour 0, les souris ont reçu une inoculation intranasale de LPS ou de véhicule seul (saline apyrogène). Nous avons effectué des tests anxio-dépressifs (*Open Field*, *Splash* et *Novelty Suppressed Feeding*), ainsi que des tests de locomotion (Rotarod et *Open Field*) et un test d'olfaction (Nourriture Cachée).

II.C.1.a.i Anxiété

Les souris C3$^{-/-}$ sont significativement moins anxieuses que leurs congénères contrôles : elles ont une latence plus courte dans le test *Novelty Suppressed Feeding* (Figure II.2, *2 ways ANOVA*, $F_{génotype(1,27)} = 6,78$, $^{*}p_{génotype} = 0,015$). Bien que l'effet soit significatif, il nécessite d'être confirmé en répétant l'expérience sur un plus grand nombre de souris C3$^{-/-}$.

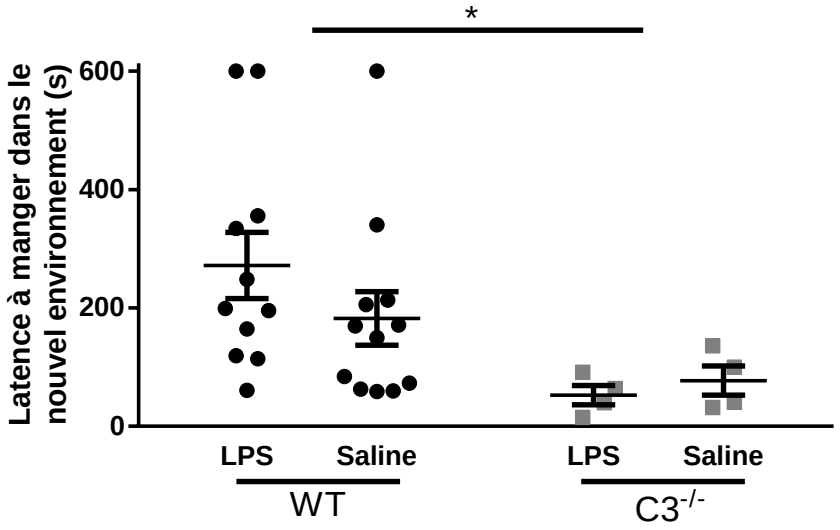


FIGURE II.2 – Test *Novelty Suppressed Feeding* chez les souris sauvages et C3$^{-/-}$.
Les souris C3$^{-/-}$ vont plus rapidement manger la nourriture que les souris contrôles (WT). $n = 4-12$ souris par groupe. *Two-Way ANOVA* (effet du génotype $^{*}p_{génotype} < 0,05$) suivie d'une comparaison multiple *post-hoc* (test de Sidak, non significatif)

D'une manière générale, nous avons remarqué que les souris C3$^{-/-}$ sont plus agressives envers les expérimentateurs que les souris sauvages immuocompétentes. Elles tentent par exemple plus souvent de s'enfuir (sauts hors de la cage ou au bas de la paillasse). Ces observations n'ont pas été directement quantifiées, mais ont été remarquées plusieurs fois par plusieurs expérimentateurs indépendants, et soulignent le phénotype peu anxieux de cette lignée de souris.

II.C.1.a.ii *Sickness Behavior*

Le LPS a un effet plus délétère sur les souris C3$^{-/-}$ que sur les contrôles dans le *splash* test (Figure II.3, comparaison par le test de Mantel-Cox chez les souris C3$^{-/-}$ inoculées de LPS et saline : $\chi^2 = 4,918$, $^{*}p = 0,0266$). Ainsi, les souris C3$^{-/-}$ seraient plus susceptibles à un phénotype dépressif suite à une inflammation (*sickness behavior*). Cependant, le nombre de souris C3$^{-/-}$ étant faible ($n = 4$ dans chaque groupe), il est nécessaire de confirmer ces résultats en répétant l'expérience sur plus d'animaux.

II.C.1.a.iii Olfaction

Pour mesurer les performances olfactives, nous avons utilisé le test de la Nourriture

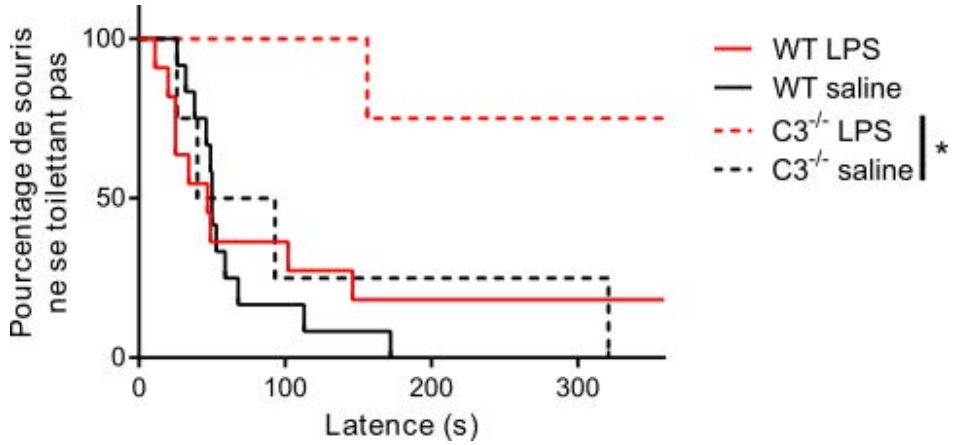


FIGURE II.3 – Anhédonie des souris $C3^{-/-}$ suite au LPS.
La latence avant le toilettage est bien supérieure chez les souris $C3^{-/-}$ ayant reçu du LPS que chez celles ayant reçu le véhicule seul (saline). WT : souris contrôles. Analyses statistiques par test Log-rank (Mantel-Cox)

Cachée (Figure II.4). Le génotype seul n'influence pas l'olfaction (Figure II.4A). En revanche, les souris $C3^{-/-}$ inoculées par le LPS semblent avoir une perte d'olfaction 3 jours après l'injection, car leur latence pour trouver les céréales cachées est plus longue que celle des souris contrôles (Figure II.4B, comparaison $C3^{-/-}$ inoculées de LPS (les deux groupes réunis) et véhicule par le test de Mantel-Cox : $\chi^2 = 10,13$, $^{**}p = 0,0015$). Cette réponse au LPS est spécifique des souris $C3^{-/-}$, car les souris sauvages inoculées de LPS ont un comportement normal dans le test de la nourriture cachée (voir article II.A, Figure 1). Cependant, nous avons répété l'expérience sur les souris déficientes en complément C3, et il existe une forte variabilité entre groupes (comparaison entre saline et LPS groupe 1 : $\chi^2 = 12,84$, $^{***}p = 0,0003$; entre saline et LPS groupe 2 non significatif $\chi^2 = 1,728$, $p = 0,19$). Il faut donc répéter l'expérience encore une fois avec un grand nombre d'animaux pour confirmer ou infirmer ces résultats.

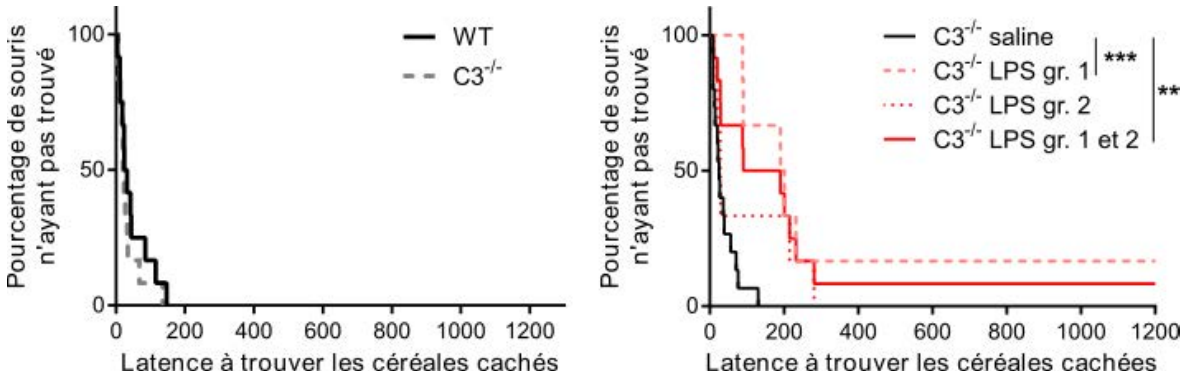


FIGURE II.4 – Olfaction des souris $C3^{-/-}$: test de la nourriture cachée
(A) : Latence à trouver les céréales entérées chez les souris $C3^{-/-}$ comparées aux sauvages (WT), en l'absence de traitement. (B) Latence à trouver les céréales entérées par les souris $C3^{-/-}$ 3 jours après inoculation intranasale de LPS ou de véhicule (saline). L'expérience a été répétée deux fois (gr. 1 = 1re expérience, gr.2 = répétition, gr. 1 et 2 = regroupement des deux), donnant des résultats très variables. Comparaison au groupe inoculé de saline par le test de Mantel-Cox $^{**}p < 0,01$, $^{***}p < 0,001$.

Quoi qu'il en soit la longue latence des souris C3$^{-/-}$ traitées par le LPS à trouver les céréales cachées ne semble pas due à une mauvaise habituation des souris aux cages de test, car elles paraissent plutôt moins anxieuses que leurs congénères sauvages dans un environnement inconnu (voir paragraphe II.C.1.a.i et Figure II.2).

II.C.1.a.iv Locomotion

Les différences de comportement entre souris C3$^{-/-}$ et sauvages vues jusqu'ici ne paraissent pas être dues à une différence de locomotion, car la vitesse moyenne et la distance parcourue dans l'*open field* ainsi que la performance au Rotarod sont similaires entre les deux génotypes (données non montrées).

En conclusion de cette étude comportementale, les souris C3$^{-/-}$ semblent moins anxieuses et plus sensibles au LPS (*sickness behavior*, perte d'olfaction) que leurs congénères sauvages. Cependant, tous ces résultats doivent être confirmés sur un plus grand nombre de souris.

II.C.1.b Souris âgées : moins anxieuses

Un nombre croissant d'études mettent en évidence une corrélation entre inflammation et vieillissement [Currais, 2015], et entre inflammation et maladies neurodégénératives (voir page 12) [Amor et al., 2014; Fakhoury, 2015]. Par ailleurs, la réponse à l'inflammation est altérée chez les souris C3$^{-/-}$, et certaines études montrent un effet bénéfique de l'absence de complément C3 sur les capacités cognitives des vieilles souris [Shi et al., 2015].

Nous avons donc réalisé sensiblement la même batterie de tests sur des souris âgées (11 mois), afin d'explorer l'effet à long terme d'une inflammation aiguë par le LPS d'une part, et l'effet de l'absence de complément C3 sur le vieillissement d'autre part (voir II.5).

Avant tout test comportemental, nous avons observé que les souris C3$^{-/-}$ de 11 mois semblent en apparence en moins bonne santé que les contrôles de même âge (alopécie, poils ternes).

II.C.1.b.i Anxiété

Comme précédemment chez les jeunes adultes, les vieilles souris C3$^{-/-}$ ont un phénotype moins anxieux que les sauvages : elles passent plus de temps au centre de l'*Open Field* (Figure II.6A, $F_{génotype(1,38)} = 13,37$, $^{***}p_{génotype} = 0,0008$). Ce résultat est comparable à ce qu'ont trouvé Shi et al. [2015].

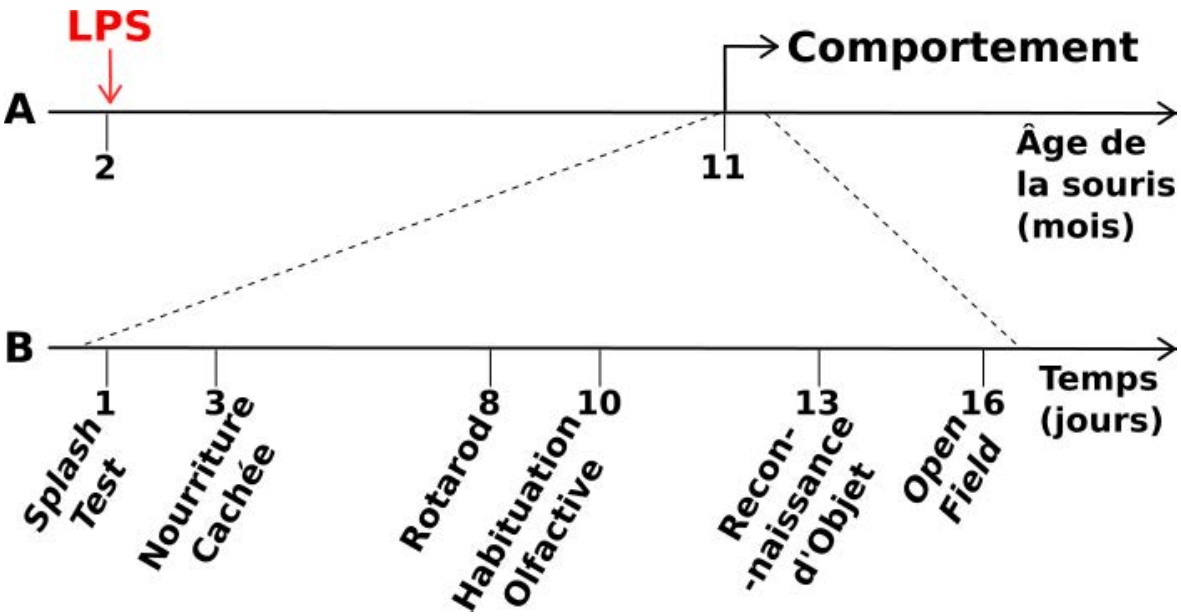


FIGURE II.5 – Décours temporel des expériences de comportement sur les vieilles souris C3$^{-/-}$.
(A), décours des traitements subis par la souris ; (B), précisions sur l'ordre des tests de comportement effectués. Les souris sont âgées de 11 mois au moment des tests de comportement.

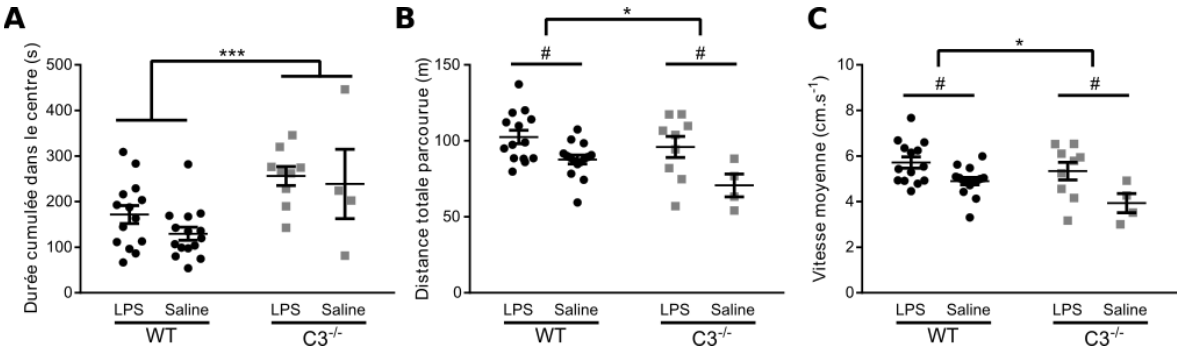


FIGURE II.6 – Comportement de vieilles souris en *Open Field*
(A) : temps cumulé passé dans le centre de l'arène. (B) Distance totale parcourue. (C) Vitesse moyenne. Analyses par *Two-Way ANOVA* (effet du génotype $^{*}p_{génotype} < 0,05$, $^{***}p_{génotype} < 0,001$) suivie d'une comparaison multiple *post-hoc* (test de Sidak), $^{\#}p_{LPSvsVéhicule} < 0,05$

II.C.1.b.ii Locomotion

Selon nos données, les souris C3$^{-/-}$ sont un peu moins actives au niveau locomoteur (distance totale parcourue, Figure II.6B, $F_{génotype(1,38)} = 4,49$, $^{*}p_{génotype} = 0,041$ et vitesse, Figure II.6C, $F_{génotype(1,38)} = 4,68$, $^{*}p_{génotype} = 0,037$). Par ailleurs nos données ainsi que celles de la littérature [Shoji et al., 2016] montrent que les souris âgées parcourent une distance plus faible en *Open Field* que leurs congénères jeunes (voir Figure 1Db de l'Article 1, Paragraphe II.A.3). Ainsi, la diminution de la locomotion des souris C3$^{-/-}$ pourrait être un signe de vieillissement locomoteur accéléré. Comme le manque de facteurs du complément a été impliqué dans des pathologies articulaires telle que les rhumatismes [Boldt et al., 2012], il n'est pas exclu que les faibles déplacements des souris C3$^{-/-}$ âgées soient dus à des douleurs ou des problèmes articulaires.

On remarque également que les souris traitées par du LPS neuf mois plus tôt semblent être un peu plus mobiles que les souris contrôle, et ce quelque soit leur génotype (II.6B et C, effet sur la distance parcourue $F_{traitement(1,38)} = 12,95$, $^{***}p_{traitement} = 0,0009$, post-hoc test $^{*}p = 0,022$ chez les C3$^{-/-}$ et $^{*}p = 0,032$ chez les sauvages ; effet sur la vitesse $F_{traitement(1,38)} = 12,8$, $^{***}p_{traitement} = 0,001$, post-hoc test $^{*}p = 0,034$ chez les sauvages). Ce dernier résultat peut paraître étonnant, car il va à l'encontre de l'idée générale actuelle selon laquelle une inflammation provoque un vieillissement accéléré.

Nous n'avons pas relevé de différence d'agilité durant le test du Rotarod, ni chez les souris déficientes en complément C3 comparées aux sauvages immunocompétents, ni chez les souris ayant subi le traitement par le LPS comparé au véhicule. Ce résultat est comparable à la littérature [Shi et al., 2015].

II.C.1.b.iii Olfaction, cognition

Les vieilles souris ont toutes des résultats similaires dans les tests d'olfaction (nourriture cachée, et habituation-déshabituation olfactive), ainsi que dans le test cognitif de la reconnaissance d'objet, quel que soit leur génotype et le traitement reçu (données non montrées).

Shi et al. [2015] ont trouvé que la mémoire hippocampique des vieilles souris C3$^{-/-}$ est meilleure que celle des sauvages. Nous ne trouvons pas de différence dans le test de reconnaissance d'objet, qui utilise la mémoire hippocampique. La divergence des résultats pourrait être due à la différence de procédure (*water T-maze* et *contextual fear conditioning* contre reconnaissance d'objet) ou à l'âge des souris (16 mois contre 11 mois).

En conclusion, les souris C3$^{-/-}$ âgées sont moins anxieuses et moins actives que leurs congénères sauvages. Elles ne semblent pas plus sensibles aux effets à long terme d'un traitement pro-inflammatoire aigu par le LPS.

II.C.2 Étude histologique

II.C.3 Élagage

Des études ont montré l'implication du complément dans l'élagage synaptique du noyau géniculé latéral du thalamus en développement (voir I.A.6.c) [Stevens et al., 2007]. En particulier, les souris C3$^{-/-}$ montrent un défaut de ségrégation des axones provenant de chaque oeil. Par ailleurs, la même équipe a montré que la microglie engouffre des particules neuronales durant la période critique pour la ségrégation des axones provenant des deux yeux, et qu'elle contient moins de particules neuronales

dans les souris C3$^{-/-}$ et *CR3 (Récepteur au complément 3)*$^{-/-}$ que chez les contrôles [Schafer et al., 2012].

Nous avons fait l'hypothèse que des mécanismes similaires pourraient être en jeu durant le développement des néo-neurones du bulbe olfactif.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons quantifié la complexité dendritique, la densité et la longueur des épines des cellules granulaires chez des souris C3$^{-/-}$ et sauvages, à deux âges différents des néo-neurones (Figure II.7).

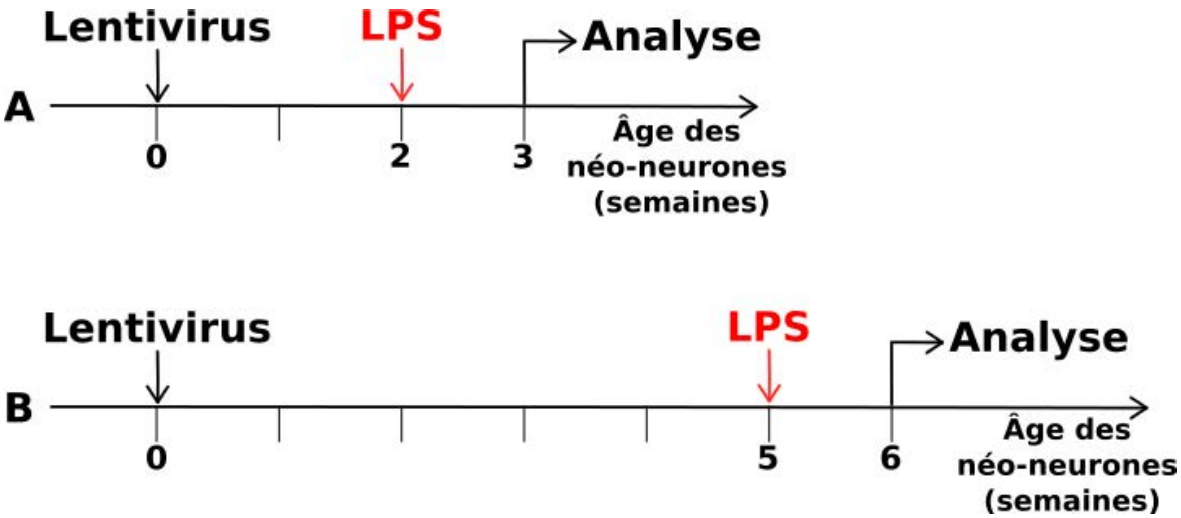


FIGURE II.7 – Décours temporel de l'analyse de la morphologie des néo-neurones des souris sauvages et C3$^{-/-}$.
(A), analyse de néo-neurones âgés de 3 semaines. (B), analyse de néo-neurones âgés de 6 semaines. Dans tous les cas, les néo-neurones ont été marqué par un lentivirus injecté dans le courant de migration rostral (LV-UbiC-TdTomato, voir partie I.E.3 et méthodes de l'article 1 partie II.A) de souris C3$^{-/-}$ et sauvages âgées de 8 à 10 semaines. Le LPS ou son véhicule (saline apyrogène) sont injectés une semaine avant l'analyse de la morphologie des néo-neurones.

II.C.3.a L'arbre dendritique des souris C3$^{-/-}$ est normal

Il est établi que l'arbre dendritique des cellules granulaires atteint un maximum autour d'un mois post-injection lentivirale dans le courant de migration rostral chez les souris sauvages [Pallotto et al., 2012]. Nous trouvons ici un résultat similaire chez les souris sauvages : la longueur de l'arbre dendritique diminue entre 3 et 6 semaines (Figure II.8A, *2 ways ANOVA* $F_{(1,116)} = 7,76$, $^{**}p_{\hat{a}ge} = 0,0085$). Nous ne retrouvons pas la même tendance chez les souris C3$^{-/-}$ (Figure II.8B), ce qui pourrait indiquer un défaut de maturation des néo-neurones. Cependant, la complexité des néo-neurones n'est pas significativement différente entre sauvages et C3$^{-/-}$. Ainsi, même si la maturation de l'arbre dendritique des cellules granulaires des C3$^{-/-}$ semble légèrement altérée, leur arbre dendritique est normal.

Par ailleurs, les cellules granulaires de 6 semaines de souris C3$^{-/-}$ semble particulièrement sensibles au traitement par le LPS : le nombre de branchement de l'abre

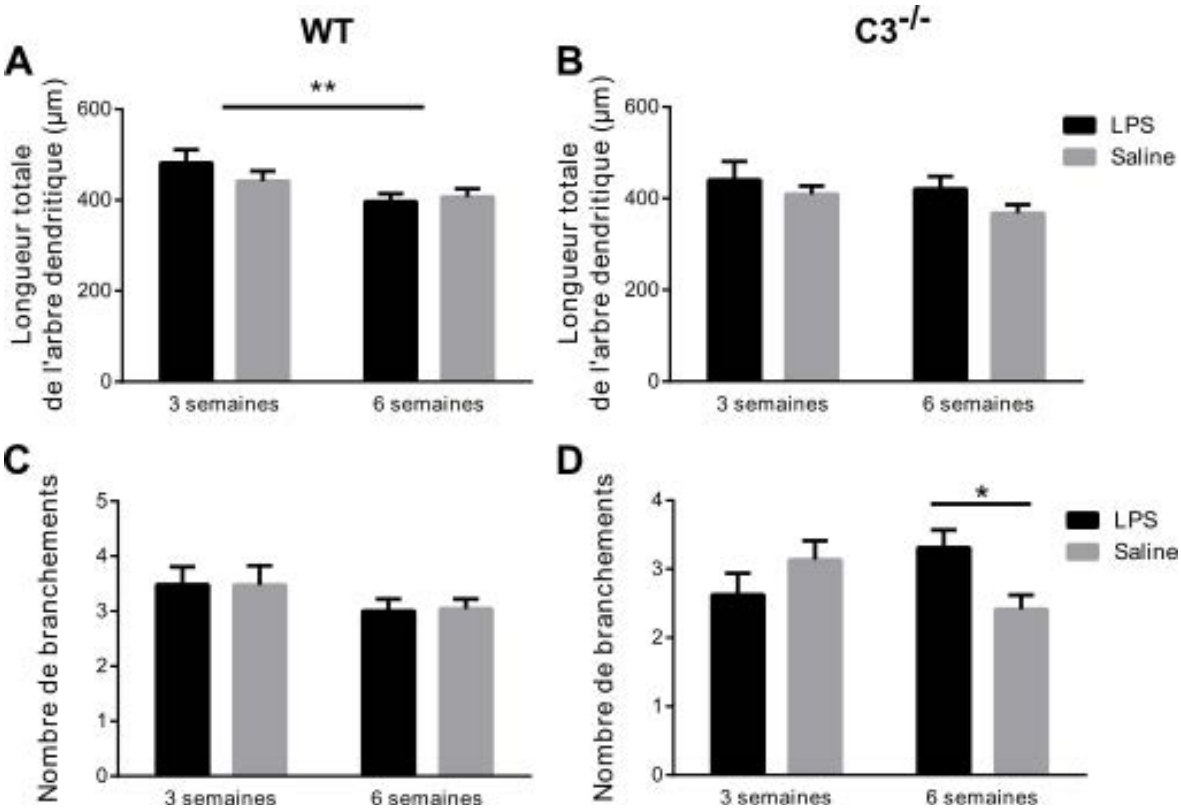


FIGURE II.8 – Évolution de la complexité dendritique des néo-neurones (cellules granulaires) de 3 à 6 semaines dans le bulbe olfactif de souris sauvages (WT) et C3$^{-/-}$.
Longueur totale (A, B) et nombre de branchements (C, D) de l'arbre dendritique de neurones âgés de 3 et 6 semaines, chez des souris sauvages (A et C), ou C3$^{-/-}$ (B et D) inoculées de LPS ou véhicule (saline). Les analyses statistiques ont été réalisées par *2-way ANOVA* suivie d'une comparaison multiple post-hoc (test de Sidak). $n = 16 - 44$ par groupe, $^{*}p_{\text{âge}} < 0,05$ $^{**}p_{\text{âge}} < 0,01$

dendritique des néo-neurones est significativement plus grand chez souris C3$^{-/-}$ traitées par le LPS que chez les contrôles traitées par la saline (Figure II.8D, test de Sidak *Post-hoc* $t = 2,541$, $^{*}p = 0,025$). Cela laisse penser que la réponse au LPS pourrait être déréglée dans les souris C3$^{-/-}$ par rapport aux souris immunocompétentes.

II.C.3.b Épines dendritiques

Nous avons ensuite étudié les épines dendritiques des néo-neurones dans trois zones différentes des cellules granulaires (Figure II.9G et Article II.A). La densité d'épines ne varie pas en fonction de l'âge des néo-neurones (entre 3 et 6 semaines), ce qui est similaire à des résultats précédents [Breton-Provencher et al., 2014; Pallotto et al., 2012]. La densité synaptique ne varie pas non plus en fonction du génotype (sauvage ou C3$^{-/-}$, Figure II.9A-E).

Le LPS augmente significativement la densité d'épines dans la zone proximale chez les souris sauvages (Figure II.9A, *2-way ANOVA* $F_{traitement(1,96)} = 10,46$, $^{**}p_{traitement} = 0,0017$, test de Sidak *Post-hoc* $t = 2,43$, $^{*}p = 0,033$). Cela suggère un impact de l'inflammation différentiel selon la zone de la cellule granulaire. Nous retrouvons la

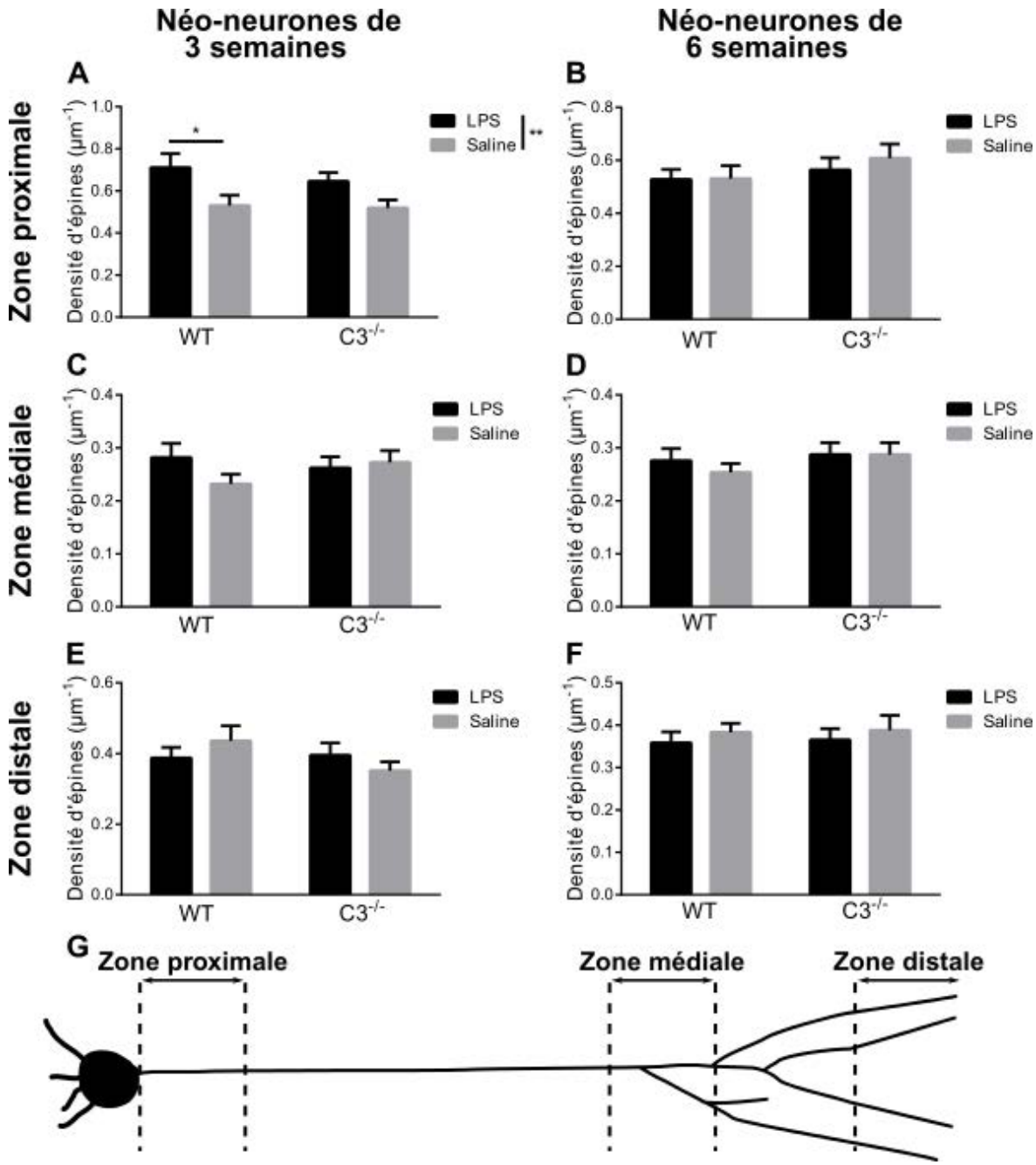


FIGURE II.9 – Comparaison de la densité d'épines dendritiques de cellules granulaires de souris sauvages (WT) et C3$^{-/-}$.
Densité d'épines dans la zone proximale (A, B), médiale (C, D) et distale (E, F) de cellules granulaires âgées de 3 semaines (A, C, E) ou 6 semaines (B, D, F) chez des souris sauvages (WT), ou C3$^{-/-}$ inoculées de LPS ou véhicule (saline). (G), Représentation schématique des différentes zones prises en compte sur une cellule granulaire. Les analyses statistiques ont été réalisées par *2-way ANOVA* suivie d'une comparaison multiple post-hoc (test de Sidak). $n = 13 - 31$ par groupe, $^{*}p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$.

même tendance, mais non significative ($t = 2,14$, $p = 0,069$) chez les souris C3$^{-/-}$.

Pour compléter l'étude des épines dendritiques des cellules granulaires, nous avons mesuré leur longueur, qui reflète leur maturité : la maturation des épines s'accompagne de la diminution de leur longueur [Harris et al., 1992; Schachtele et al., 2011]. Selon nos données, les épines dendritiques sont en moyenne moins longues dans les cellules

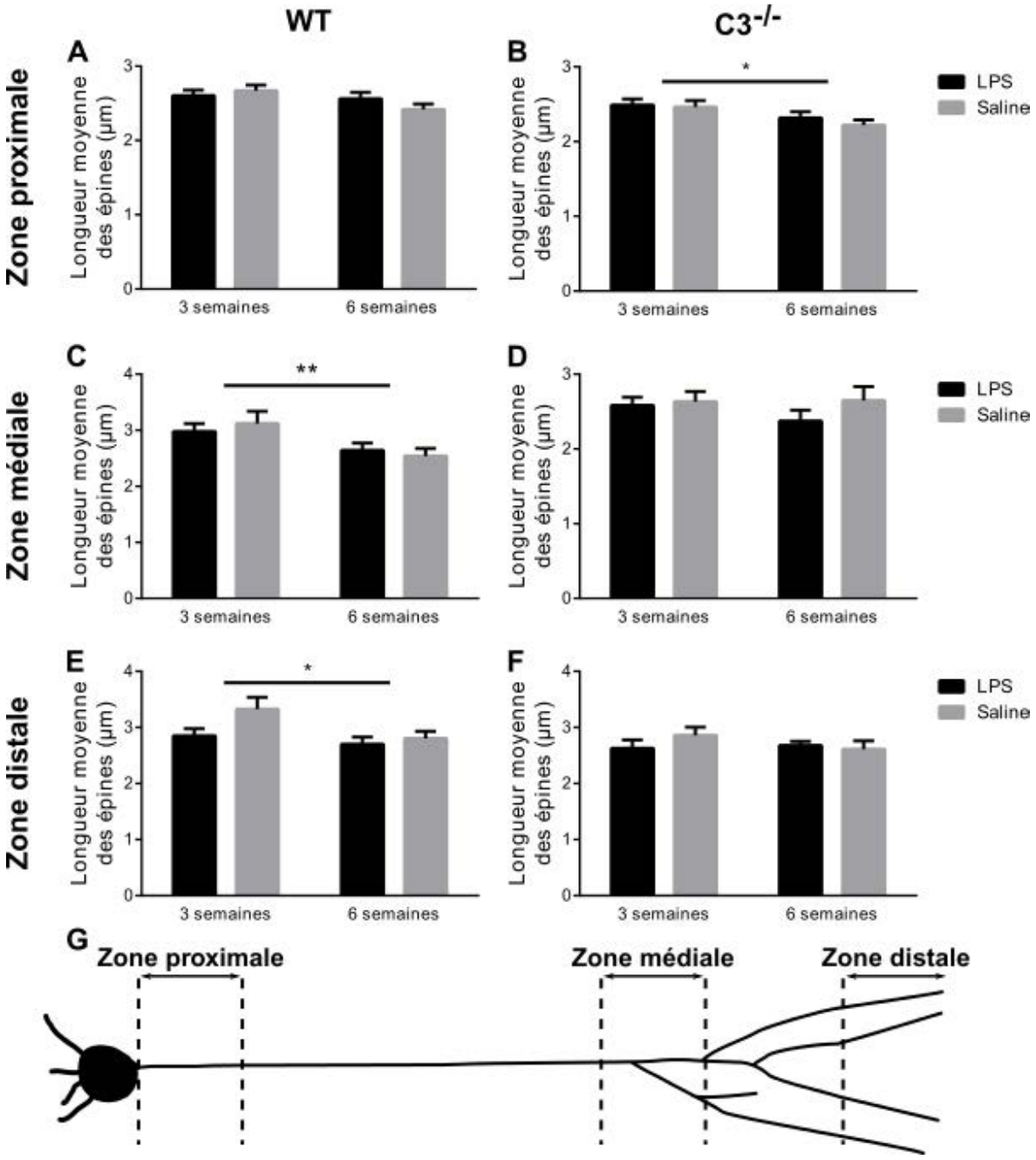


FIGURE II.10 – Évolution de la longueur moyenne des épines dendritiques de cellules granulaires entre 3 et 6 semaines.
Longueur moyenne des épines dans la zone proximale (A, B), médiale (C, D) et distale (E, F) de cellules granulaires âgées de 3 et 6 semaines provenant de souris sauvages (A, C, E) ou C3$^{-/-}$ (B, D, F) inoculées de LPS ou véhicule (saline). (G), Représentation schématique des différentes zones prises en compte sur une cellule granulaire. Les analyses statistiques ont été réalisées par *2-way ANOVA* suivie d'une comparaison multiple post-hoc (test de Sidak). $n = 13 - 31$ par traitement, $^{*}p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$.

granulaires âgées de 6 semaines comparées à celles âgées de 3 semaines dans les zones distale (Figure II.10E, *2-way ANOVA* $F_{\hat{a}ge(1,97)} = 5,11$, $^{*}p_{\hat{a}ge} = 0,026$) et médiale (Figure II.10C, *2-way ANOVA* $F_{\hat{a}ge(1,121)} = 8,39$, $^{**}p_{\hat{a}ge} = 0,0048$) chez les souris sauvages, et dans la zone proximale chez les souris C3$^{-/-}$ (Figure II.10B, *2-way ANOVA* $F_{\hat{a}ge(1,97)} = 6,57$, $^{*}p_{\hat{a}ge} = 0,012$). Nos données confirment donc que la maturation des

épines entre cellules granulaires âgées de 3 et 6 semaines s'accompagne de la diminution de leur longueur.

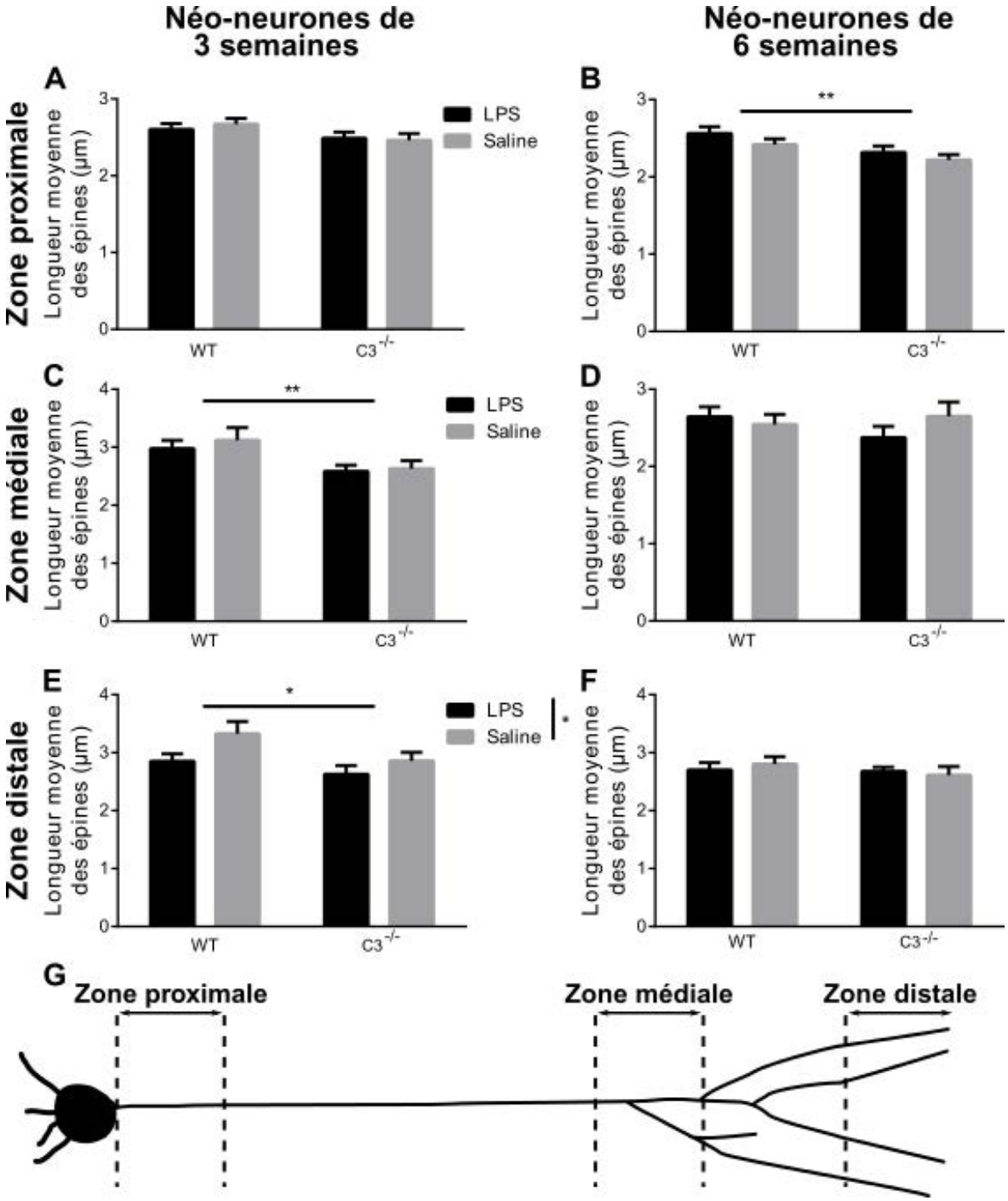


FIGURE II.11 – Comparaison de la longueur moyenne des épines dendritiques de cellules granulaires de souris sauvages (WT) et C3$^{-/-}$.
Densité d'épines dans la zone proximale (A, B), médiale (C, D) et distale (E, F) de cellules granulaires âgées de 3 semaines (A, C, E) ou 6 semaines (B, D, F) chez des souris sauvages (WT), ou C3$^{-/-}$ inoculées de LPS ou véhicule (saline). (G), Représentation schématique des différentes zones prises en compte sur une cellule granulaire. Les analyses statistiques ont été réalisées par *2-way ANOVA* suivie d'une comparaison multiple post-hoc (test de Sidak). $n = 13 - 31$ par traitement, $^{*}p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$.

En outre, les épines dendritiques des cellules granulaires de 3 semaines de souris

C3$^{-/-}$ sont significativement moins longues que celles des souris sauvages dans les zones médiale (Figure II.11C, *2-way ANOVA* $F_{génotype(1,78)} = 8,54$, $^{**}p_{génotype} = 0,0046$) et distale (Figure II.11E, *2-way ANOVA* $F_{génotype(1,91)} = 4,52$, $^{*}p_{génotype} = 0,036$), tandis que les épines des néo-neurones de 6 semaines de souris C3$^{-/-}$ sont moins longs dans la zone proximale (Figure II.11B, *2-way ANOVA* $F_{génotype(1,121)} = 8,14$, $^{**}p_{génotype} = 0,0051$). Ainsi, l'absence de complément C3 semble affecter la longueur, et donc la maturation des épines des cellules granulaires.

Nous n'observons pas d'effet du traitement pro-inflammatoire par le LPS sur la longueur des épines excepté dans la zone distale des cellules granulaires de 3 semaines, où le LPS semble la diminuer (Figure II.11E, *2-way ANOVA* $F_{traitement(1,91)} = 4,76$, $^{*}p_{traitement} = 0,032$). L'activation de la microglie par le LPS a donc un effet minime sur les épines des néo-neurones.

En conclusion de cette étude morphologique des néo-neurones, l'absence de complément C3 affecte peu l'arborisation des cellules granulaires, mais diminue la longueur des épines dendritiques de manière régulée dans l'espace et le temps.

III Discussion

Les mécanismes de régulation de la neurogenèse adulte sont encore mal connus. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au rôle de la microglie dans plusieurs aspects de la neurogenèse adulte bulbaire (phagocytose, élagage), en conditions normales ou pathologiques : déafférentation sensorielle, inflammation par le LPS, déficience en facteurs du complément C3 ou encore stress chronique.

III.A Phagocytose des néo-neurones par la microglie

Pour approcher le rôle de la microglie dans le contrôle et la régulation de la neurogenèse adulte, nous avons combiné des marquages immunohistochimiques de la microglie (Iba-1) et des injections de vecteurs viraux pour marquer soit les néo-neurones soit les neurones pré-existants. Cela nous a permis de mettre en évidence les interactions entre cellules granulaires et microglie en microscopie confocale. Nous avons observé de nombreux contacts entre microglie et neurones ainsi que la phagocytose d'un certain nombre de particules neuronales par la microglie. Nous avons ainsi démontré *in vivo* l'importance de la microglie dans la neurogenèse bulbaire.

Nous avons montré que la microglie contient plus d'inclusions provenant de néo-neurones que de neurones pré-existants. Cet effet est fortement renforcé en cas de déafférentation du bulbe olfactif (Figure 1 de l'Article 1, paragraphe II.A.3). En cas de coupure des entrées sensorielles du bulbe olfactif, nous avons montré que la microglie phagocyte préférentiellement les néo-neurones, régulant ainsi le taux de neurogenèse adulte bulbaire en fonction de l'activité sensorielle.

Plusieurs questions restent cependant en suspens sur ce point.

1. Est-ce la date de naissance ou l'âge du neurone qui module sa phagocytose par la microglie ? Nous avons choisi dans cette étude de faire varier la date de naissance

des neurones (néonataux à P6d ou à l'âge adultes à P8w), chez des souris ayant le même âge lors des différents traitements (LPS ou dichlobénil, voir Figure 1E de l'Article 1, Paragraphe II.A.3). Ainsi, au moment du traitement (une semaine avant l'analyse), les neurones nés à P6d ont 10 semaines tandis que ceux nés à P8w n'ont que 2 semaines. Il serait intéressant de reproduire l'expérience sur des neurones nés à P6d ayant 2 semaines, et sur des neurones nés à P8w ayant 10 semaines afin de préciser l'impact de l'âge du neurone (indépendemment de sa date de naissance) sur la phagocytose par la microglie.

2. Suite à la déafférentation, les néo-neurones sont-ils plus phagocytés que les neurones néonataux parce qu'ils subissent plus d'apoptose ? Cela revient à se demander si la microglie phagocyte des néo-neurones déjà morts, en cours d'apoptose ou en bonne santé. Enfin, les particularités cellulaires des néo-neurones qui les rendent plus susceptibles à l'apoptose et/ou à la phagocytose par la microglie restent à découvrir.
3. La phagocytose préférentielle des néo-neurones suite au traitement par le dichlobénil est-elle due à la perte olfactive et/ou à l'inflammation subséquente ? Il serait intéressant de répondre à cette question en étudiant la phagocytose par la microglie suite à une déafférentation combinée à un traitement anti-inflammatoire, par exemple par la minocycline.

III.B Rôle de la microglie dans le remodelage de l'arbre dendritique

Nous avons étudié l'arbre dendritique des néo-neurones dans plusieurs contextes qui peuvent modifier le fonctionnement et/ou l'état d'activation de la microglie : inflammation par le LPS, absence de complément C3 (souris $C3^{-/-}$), ou encore variation des états mentaux (par la corticostérone et/ou la fluoxétine).

Nous avons tout d'abord constaté que les cellules granulaires issues de la neurogenèse adulte chez les souris $C3^{-/-}$ ont un léger défaut de maturation au niveau de l'arbre dendritique : alors que chez les souris sauvages immunocompétentes, la longueur de l'arbre dendritique diminue entre les néo-neurones âgés de 3 à 6 semaines, nous n'observons pas de diminution significative de la longueur de l'arbre chez les souris $C3^{-/-}$ (Figure II.8). Cependant, ce défaut a peu de répercussions car nous n'observons pas de différence significative entre les arbres dendritiques (longueur totale et nombre de branchements) de souris contrôle et $C3^{-/-}$. Ainsi, soit le développement ou le maintien des dendrites des cellules granulaires est indépendant du complément C3, soit il pourrait exister des mécanismes de compensation.

L'activation microgliale par un stimulus microbien tel que le LPS n'a pas d'impact

sur l'arbre dendritique des cellules granulaires des souris sauvages , que les cellules granulaires soient issues de la neurogenèse adulte ou de la neurogenèse néonatale (Figure II.8 et de l'Article 1, Paragraphe II.A.3). Par ailleurs, les cellules granulaires se développant dans un contexte déafférenté par le dichlobénil ont un arbre dendritique normal (données non montrées). Ces résultats suggèrent qu'en règle générale l'arbre dendritique des cellules granulaires n'est pas affecté par un contexte inflammé.

L'intervention de la microglie dans la différence de taille des arbres dendritiques des néo-neurones vue dans l'Article 2 (paragraphe II.B.3 Figures 8) n'est pas claire. La fluoxétine est un inhibiteur de la recapture de la sérotonine, et provoque donc une augmentation du taux de ce neuromodulateur présent dans le milieu extra-cellulaire. L'allongement de l'arbre dendritique par la fluoxétine pourrait être lié à la forte innervation sérotoninergique du bulbe olfactif, qui s'est montrée pro-neurogénique dans d'autres études (voir paragraphe I.B.4.a). Mais la fluoxétine est également connue pour inhiber l'activation microgliale *in vitro* [Chung et al., 2011]. Par ailleurs, la microglie possède le récepteur à la sérotonine, et il semble *in vitro* qu'en présence de ce neuromodulateur l'activité phagocytaire de la microglie soit réduite [Krabbe et al., 2012]. Les effets de la fluoxétine sur les néo-neurones pourraient donc en partie être dus à l'action de la microglie : en temps normal la microglie phagocyterait certaines branches des néo-neurones en développement, tandis que lorsque la concentration de sérotonine est augmentée par la fluoxétine, cette phagocytose serait diminuée, et l'arbre dendritique allongé.

Il est intéressant de noter que lorsque les néo-neurones se développent en présence de minocycline, leur arbre dendritique est allongé ($t_{minoVScontrôle} = 2,44$, $^{*}p_{minoVScontrôle} = 0,048$, données non montrées). La minocycline est connue pour inhiber la microglie mais a également des effets sur d'autres cibles cellulaires [Orsucci et al., 2009]. Il serait par conséquent intéressant de confirmer que l'allongement de l'arbre dendritique des cellules granulaires par la minocycline est bien dû à l'inactivation microgliale en utilisant un autre anti-inflammatoire (par exemple l'ibuprofène). L'allongement de l'arbre en présence de minocycline et de fluoxétine nous conduit à proposer qu'un niveau basal d'activation microgliale pourrait être nécessaire à l'acquisition de l'arbre dendritique des cellules granulaires, peut être en phagocytant certaines parties de l'arbre. Ainsi, la microglie pourrait avoir un rôle physiologique dans le développement et/ou l'élagage des néo-neurones.

Nous avons choisi d'étudier la morphologie des cellules granulaires situées dans la couche des grains profonde car elles sont de formes plus homogènes que les cellules granulaires de la couche des grains superficielle (voir Figure I.14) [Lim and Alvarez-Buylla, 2014]. Selon une étude préliminaire que nous avons effectuée, les cellules granulaires profondes et superficielles ont une sensibilité différente à la déafférentation (données

non montrées). La longueur totale et le nombre de branchements de l'arbre dendritique des cellules granulaires superficielles de souris ayant subi une déafférentation olfactive est inférieure au contrôle ($t_{dichloVScontrôle} = 5,37$, $^{****}p_{dichloVScontrôle} < 0,0001$), tandis que les cellules granulaires profondes ne semblent pas affectées.

Etant donné que nos injections stéréotaxiques de lentivecteurs pour marquer les néo-neurones ont été effectuées dans le courant de migration rostral, nous devrions avoir une moins grande variabilité de la proportion des différents types de cellules granulaires que si nous avions injecté la zone sous-ventriculaire (voir Figure I.14). Cependant, il faudrait étudier plus en détails les cellules granulaires de la couche des grains superficielle, pour vérifier que les différences d'arbre dendritique que nous observons sont bien dues à un remaniement de l'arbre dendritique, et non à un biais de la proportion des différents types de cellules (voir Figure I.14).

En résumé, la microglie semble avoir un rôle dans l'acquisition de l'arbre dendritique des cellules granulaires de la couche des grains profonde en conditions physiologiques, mais pas en conditions pathologiques comme lors d'inflammation par le LPS, d'une déafférentation par le dichlobénil ou d'un manque de complément C3.

III.C Rôle de la microglie dans l'élagage des épines dendritiques des néo-neurones

Pour évaluer le rôle de la microglie dans l'élagage des épines dendritiques des cellules granulaires, nous avons étudié les épines dendritique des néo-neurones dans plusieurs contextes qui peuvent modifier l'état d'activation et/ou le fonctionnement de la microglie : déafférentation par le dichlobénil, inflammation par le LPS, absence du complément C3 (souris $C3^{-/-}$), ou encore variation des états mentaux (par la corticostérone et/ou la fluoxétine).

La densité d'épines des cellules granulaires n'est pas affectée par ces traitements qui modulent l'activité microgliale :

— Le LPS, qui active la microglie, ne change pas la densité des épines dendritiques, sauf dans la zone proximale des cellules granulaires (voir article 1 paragraphe II.A.3 Figure 2, et données non publiées paragraphe II.C.3.b Figure II.9).

— L'absence de complément C3 dans les souris de génotype $C3^{-/-}$, qui a été montrée comme affectant l'élagage par la microglie dans d'autres modèles de neurones en développement [Mastellos, 2014], n'influence pas la densité d'épines des cellules granulaires nées à l'âge adulte (voir Figure II.9).

— La corticostérone chronique, qui active la microglie [Frank et al., 2014], et la fluoxétine qui augmente la phagocytose (voir paragraphe III.B) n'ont pas d'effet sur la densité d'épines (données non montrées).

— La déafférentation par le dichlobénil diminue la densité d'épines des cellules granulaires en fonction de leur âge, mais cet effet ne semble pas dû à une action de la microglie activée, car le traitement anti-inflammatoire par la minocycline ne restaure pas la densité d'épines (voir II.A.3 Figure 2).

Bien que nous n'ayons pas de preuve directe, nous présentons ici un faisceau d'arguments en défaveur de l'implication de la microglie dans le remodelage des épines dendritiques des cellules granulaires issues de la neurogenèse adulte bulbaire. Pour confirmer cette hypothèse, il est nécessaire d'étudier l'interaction entre les néo-neurones (et en particulier leurs épines) et la microglie de manière dynamique en utilisant par exemple la microscopie à 2 photons, et/ou en inhibant spécifiquement la microglie par l'utilisation de souris CX3CR1$^{-/-}$ ou en tuant spécifiquement la microglie (par exemple avec du clodronate liposomal).

En particulier, le complément C3 ne semble pas impliqué dans l'acquisition de la densité d'épines appropriée, contrairement à ce qui a été observé dans d'autres structures [Mastellos, 2014]. Cependant, nous ne pouvons exclure un rôle du C3 compensé par une autre voie de signalisation chez les souris C3$^{-/-}$.

Ces différences d'implication de la microglie entre la neurogenèse adulte bulbaire et la neurogenèse embryonnaire pourraient s'expliquer par l'hétérogénéité de la répartition dans l'espace (selon les régions cérébrales) et le temps (entre le développement embryonnaire et l'âge adulte) de la microglie (voir paragraphe I.A.4).

III.D Phénotype des souris C3KO

Le complément – et notamment le C3 – est impliqué dans certains mécanismes de phagocytose et d'élagage durant la neurogenèse embryonnaire et néo-natale [Mastellos, 2014]. Dans ce travail, nous avons recherché l'impact de l'absence de C3 sur la neurogenèse adulte bulbaire et sur le comportement – notamment olfactif – des souris.

Les souris C3$^{-/-}$ apparaissent moins anxieuses et plus sensibles au LPS que les souris immunocompétentes, notamment avec une perte olfactive, et un fort *sickness behavior* suite à l'inoculation intranasale de LPS (voir partie II.C.1). Il est cohérent que les souris C3$^{-/-}$, qui sont immunodéficientes, aient une réaction altérée à une stimulation microbienne. Ces résultats sont en accord avec la littérature [Perez-Alcazar et al., 2014; Shi et al., 2015], mais nécessitent d'être répliqués pour être confirmés.

Afin d'explorer l'effet à long terme d'une inflammation aiguë par le LPS d'une part, et l'effet de l'absence de complément C3 sur le vieillissement d'autre part, nous avons étudié le comportement des souris $C3^{-/-}$ âgées (11 mois). Là encore, nous observons un faible niveau d'anxiété des souris $C3^{-/-}$ comparées aux contrôles (voir Figure II.6). Selon nos données, la motricité des souris $C3^{-/-}$ âgées est inférieure aux contrôles, tandis que leur mémoire hippocampique semble normale par rapport aux congénères immunocompétents. Ces deux résultats sont différents d'une étude précédente menée sur des souris de 16 mois [Shi et al., 2015], ce qui pourrait s'expliquer par la différence d'âge des souris et de nature des tests entre les études. Étant donné le faible niveau d'anxiété des souris $C3^{-/-}$ comparées aux contrôles (voir paragraphe II.C.1.a.i et II.C.1.b.i), les tests *water T-maze* et *contextual fear conditioning* utilisés dans l'étude de Shi et al. [2015] ne sont peut être pas les plus appropriés pour déterminer objectivement la mémoire des souris. En effet, ces tests sont anxiogènes (peur de l'eau dans le cas du *water T-maze*, et des chocs électriques dans le cas du *contextual fear conditioning*). Par conséquent, la différence de comportement dans ces tests entre souris $C3^{-/-}$ et sauvages pourrait en partie venir de la variation du niveau d'anxiété induite par le contexte du test.

Comme évoqué précédemment (paragraphe III.C), la densité des épines dendritiques des cellules granulaires est normale chez les souris $C3^{-/-}$, suggérant que le complément C3 n'est pas impliqué dans l'acquisition de la densité d'épines appropriée, contrairement à ce qui a été vu dans d'autres structures [Schafer et al., 2012]. Là encore cependant, nous ne pouvons exclure un rôle du C3 compensé par une autre voie de signalisation chez les souris $C3^{-/-}$.

Le paramètre sur lequel les cellules granulaires des souris $C3^{-/-}$ sont le plus touchées, de manière régulée dans l'espace et le temps, est la longueur des épines dendritiques (Figures II.10 et II.11). Dans les zones médiale et distale, la longueur des épines est plus basse que chez les souris sauvages sur les néo-neurones de 3 semaines, mais est normale sur les cellules granulaires de 6 semaines. Nous proposons que le développement des néo-neurones serait altéré chez les souris $C3^{-/-}$, mais compensé ensuite par un mécanisme qui reste à déterminer, pour donner des neurones matures d'apparence normale. Cependant, dans la zones proximale, la tendance est inverse (épines raccourcies sur les néo-neurones de 6 semaines et non de 3 semaines). Cette disparité pourrait s'expliquer par la différence de maturation des épines le long de l'arbre dendritique (voir paragraphe I.C.5.b), et l'hétérogénéité du type de synapses selon les zones neuronales (Figure I.16).

III.E Applicabilité de nos résultats à l'espèce humaine

III.E.1 Le modèle murin

Nos études ont été réalisées chez la lignée de souris B6, ce qui pose le problème de la transposition des résultats entre espèces, et en particulier dans l'espèce humaine.

Le modèle murin a de nombreux avantages : phénomènes physiologiques communs avec tous les mammifères, facilité d'élevage (avec un cycle de reproduction relativement court), nombreuses modifications génétiques possibles...

Cependant, intrinsèquement, une souris réagit différemment d'un être humain, notamment au niveau du comportement (par exemple,la réaction très aversive de la souris face à l'odeur du renard [Lazarini et al., 2014] n'existe pas chez l'être humain), et du système immunitaire (par exemple, la souris est beaucoup moins sensible que l'être humain à l'inflammation par le LPS) [Mestas and Hughes, 2004].

III.E.2 Choix du sexe

La plupart des études chez la souris sont réalisées exclusivement sur les mâles. Les raisons principales en sont l'habitude et la facilité technique. En effet, étudier les femelles nécessite souvent de déterminer leur phase du cycle menstruel (par frottis vaginal, ce qui est un peu fastidieux) car les hormones peuvent influer sur le comportement et la physiologie [Asarian and Geary, 2013; Tarttelin and Gorski, 1971]. Or, il existe des différences inter-sexes (d'origine hormonale ou non), au niveau physiologique, cérébral et comportemental [Arnold et al., 2013; Bakker and Baum, 2008]. Toutes les études devraient donc être effectuées sur les deux sexes (notamment les études précliniques).

Certaines maladies touchent de manière prépondérante les femmes, et sont pourtant étudiées principalement chez les souris mâles. C'est le cas de la dépression, c'est pourquoi une étude sur des souris femelles, réalisée par nos collaborateurs de l'université de Chatenay-Malabry, a été mise en place en parallèle de celle réalisée dans notre laboratoire (Article 2, paragraphe II.B.3). Cependant, cette étude n'est pas encore publiée, suite à des difficultés expérimentales : les souris femelles sont résistantes au traitement par la corticostérone, et ne développent pas de phénotype dépressif. Cet exemple souligne une fois de plus la différence de réaction entre mâles et femelles, et la nécessité de tester les molécules actives sur les femelles.

III.E.3 Conditions d'élevage des souris

La souris de laboratoire vit dans un milieu très différent de son milieu naturel, beaucoup plus restreint, pauvre et constant. En laboratoire, on essaie de recréer un peu de la diversité naturelle par enrichissement du milieu. Mais les milieux enrichis sont toujours plus pauvres que le milieu auquel est confrontée une souris dans la nature. Cela peut avoir des conséquences sur le développement, notamment au niveau cérébral, cognitif et social [Lewis, 2004].

Un autre aspect très appauvri dans l'élevage conventionnel des souris de laboratoire est la stimulation immunologique. La tendance actuelle en biologie est au contrôle du maximum de paramètres, pour discriminer les effets du paramètre d'intérêt au milieu de tous les autres qui pourraient interférer, et maximiser la reproductibilité des résultats. Pour ce faire, les animaleries sont maintenues dans un état quasi-stérile, donc les souris sont anormalement peu en contact avec des micro-organismes [Pritchett-Corning et al., 2009]. Ainsi, le système immunitaire des souris de laboratoire garde des caractéristiques immatures (notamment au niveau de la différenciation des lymphocytes T), alors que les congénères provenant de magasins d'animaux de compagnie ou capturés dans la nature ont un système immunitaire beaucoup plus proches des êtres humains adultes [Beura et al., 2016]. Il suffit d'introduire des souris de magasin animalier dans les cages de souris de laboratoire pour que ces dernières acquièrent un système immunitaire plus mature.

Nous pouvons donc nous interroger sur la pertinence de certains résultats trouvés sur des souris de laboratoire, élevées dans des conditions si éloignées de leur physiologie. Notamment, pour nous qui étudions la microglie , sa physiologie serait-elle différente chez des animaux en contact avec plus d'agents pathogènes ? Bien que la plupart des agents pathogènes ne puissent pas traverser la barrière hémato-encéphalique pour pénétrer dans le système nerveux central, l'état d'activation du système immunitaire périphérique influence fortement la microglie (voir paragraphe I.A.5.a.iii). Il est donc probable que l'exposition à des pathogènes modifie le fonctionnement de la microglie, et nos résultats seraient probablement différents chez des souris moins préservées immunologiquement.

III.E.4 Neurogenèse adulte et olfaction

L'olfaction paraît assez rudimentaire chez l'être humain comparé aux autres mammifères : la taille relative de l'épithélium olfactif, du bulbe olfactif et des aires corticales associées est petite, et le nombre de récepteurs olfactifs exprimés est relativement faible (350 types différents chez l'être humain contre 1100 chez la souris). En outre, le nombre de glomeruli chez l'être humain est environ trois fois plus grand que chez la souris [Ma-

resh et al., 2008], ce qui suggère que le codage de l'information olfactive n'est peut être pas tout à fait identique entre espèces.

La neurogenèse adulte existe bien dans l'espèce humaine, mais les néo-neurones nés dans la zone sous-ventriculaire ne semblent pas migrer vers le bulbe olfactif (voir paragraphe I.C.7) [Bergmann et al., 2012; Sanai et al., 2011]. Il est donc difficile d'intégrer nos résultats dans une perpective translationnelle directe. Il faut plutôt les voir comme une étude de biologie fondamentale, permettant de comprendre des mécanismes de plasticité cérébrale, qui pourraient sur le long terme être applicable à des pathologies humaines.

La compréhension des mécanismes qui permettent la plasticité liée à la neurogenèse adulte chez la souris pourrait d'ailleurs aboutir à la découverte de voies de signalisation uniques, éventuellement applicables au traitement d'atteintes du système nerveux central chez l'humain. Par exemple, chez la souris, la neurogenèse adulte bulbaire peut régénérer les cellule périglomérulaire perdues suite à une injection de 6-OHDA [Lazarini et al., 2014]. Comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires permettant le remplacement de ces neurones dopaminergique est une piste intéressante de traitement de la maladie de Parkinson.

III.E.5 Applications à des pathologies humaines

Comme nous l'avons déjà évoqué paragraphe I.C.6.d, il existe un fort lien chez l'être humain entre dépression et perte olfactive [Kohli et al., 2016; Negoias et al., 2010; Pause et al., 2001]. Une certaine proportion de patients souffrant de dépression ne répondent pas aux anti-dépresseurs c'est-à-dire que leur état dépressif n'est pas endigué par la prise d'anti-dépresseurs. De plus, les anti-dépresseurs ont une certaine latence (de l'ordre d'un à deux mois) avant d'avoir un effet sur le phénotype dépressif des patients. Ainsi, il serait très intéressant d'avoir un outil de diagnostique permettant de quantifier précocément la réponse aux anti-dépresseurs.

Nous avons montré (partie II.B) que les pertes olfactives observées dans un modèle murin d'anxiété-dépression sont en grande partie restaurées par l'anti-dépresseur fluoxétine. Une étude clinique est en cours à l'hôpital du Kremlin-Bicêtre pour évaluer les troubles olfactifs ainsi que la neurogenèse adulte hippocampique (en mesurant la taille de l'hippocampe par IRM) chez des patients dépressifs traités par des anti-dépresseurs. Le but de cette étude est d'évaluer si un test olfactif pourrait prédire l'efficacité d'un anti-dépresseur sur un patient donné, avant même que les effets anti-dépresseurs à proprement parler ne se mettent en place.

Dans cette thèse, nous avons étudié l'implication de la microglie dans les mécanismes de plasticité au niveau du bulbe olfactif, notamment suite à une inflammation.

Certaines pathologies sont connues pour allier inflammation ou infection et troubles cognitifs. Le sens olfactif est très sensible aux lésions neurotoxiques, aussi des troubles olfactifs pourraient être un bon marqueur de troubles neurosensoriels ou cognitifs plus généraux. Plusieurs études cliniques sont en cours ou en projet dans cette thématique, notamment sur des enfants atteints de cytomégalovirus congénital, et des adultes atteints de polyarthrite rhumatoïde. Le but de ces études cliniques est d'évaluer l'olfaction comme marqueur précoce de troubles des fonctions supérieures, et ainsi permettre une prise en charge plus précoce et plus adaptée des patients.

IV Conclusion générale et perspectives

Dans les différentes études réalisées au cours de cette thèse, nous avons modulé l'activité microgliale de plusieurs manières, avec des conséquences variées sur les néo-neurones issus de la neurogenèse adulte bulbaire. Les principales conclusions sont résumées dans la Figure IV.1.

L'activation de la microglie par la toxine olfactive dichlobénil ou par un stimulus bactérien par LPS (à gauche sur la Figure IV.1) conduit globalement à la suppression d'épines dendritiques, de manière contrôlée dans l'espace (selon la zone de l'arbre dendritique) et le temps (selon l'âge du neurone au moment du traitement). Par ailleurs, le dichlobénil coupe l'olfaction des souris, et augmente la phagocytose de morceaux de néo-neurones par les cellules microgliales. **La microglie est donc impliquée dans la plasticité du réseau neuronal du bulbe olfactif en fonction des expériences sensorielles.**

Le traitement par la fluoxétine ou par la minocycline ne conduisent pas à l'activation de la microglie – ils auraient plutôt tendance à la dé-activer – (partie droite sur la Figure IV.1). Ces deux traitements ont pour conséquence une élongation de l'arbre dendritique des cellules granulaires, ce qui nous amène à proposer qu'**un niveau basal d'activation microgliale pourrait être nécessaire à l'acquisition de l'arbre dendritique des néo-neurone, peut-être *via* la phagocytose de parties de dendrites.** La fluoxétine induit également des défauts olfactifs comme la diminution de la discrimination fine et de la mémoire olfactive : nous avons mis en évidence dans ce modèle une corrélation entre morphologie des cellules granulaires et olfaction.

Les effets du LPS et du dichlobénil sont très localisés, et dépendent de l'âge du neurone au moment du traitement. Par ailleurs, l'effet du dichlobénil sur la densité d'épines ne semble pas lié à l'activation microgliale, puisque le blocage de cette activation par la minocycline n'empêche pas l'élagage. Ainsi, la corrélation entre activation de la microglie et élagage des cellules granulaires et faible. Cela suggère que **l'élagage des néo-neurones du bulbe olfactif pourrait être indépendant de la microglie.**

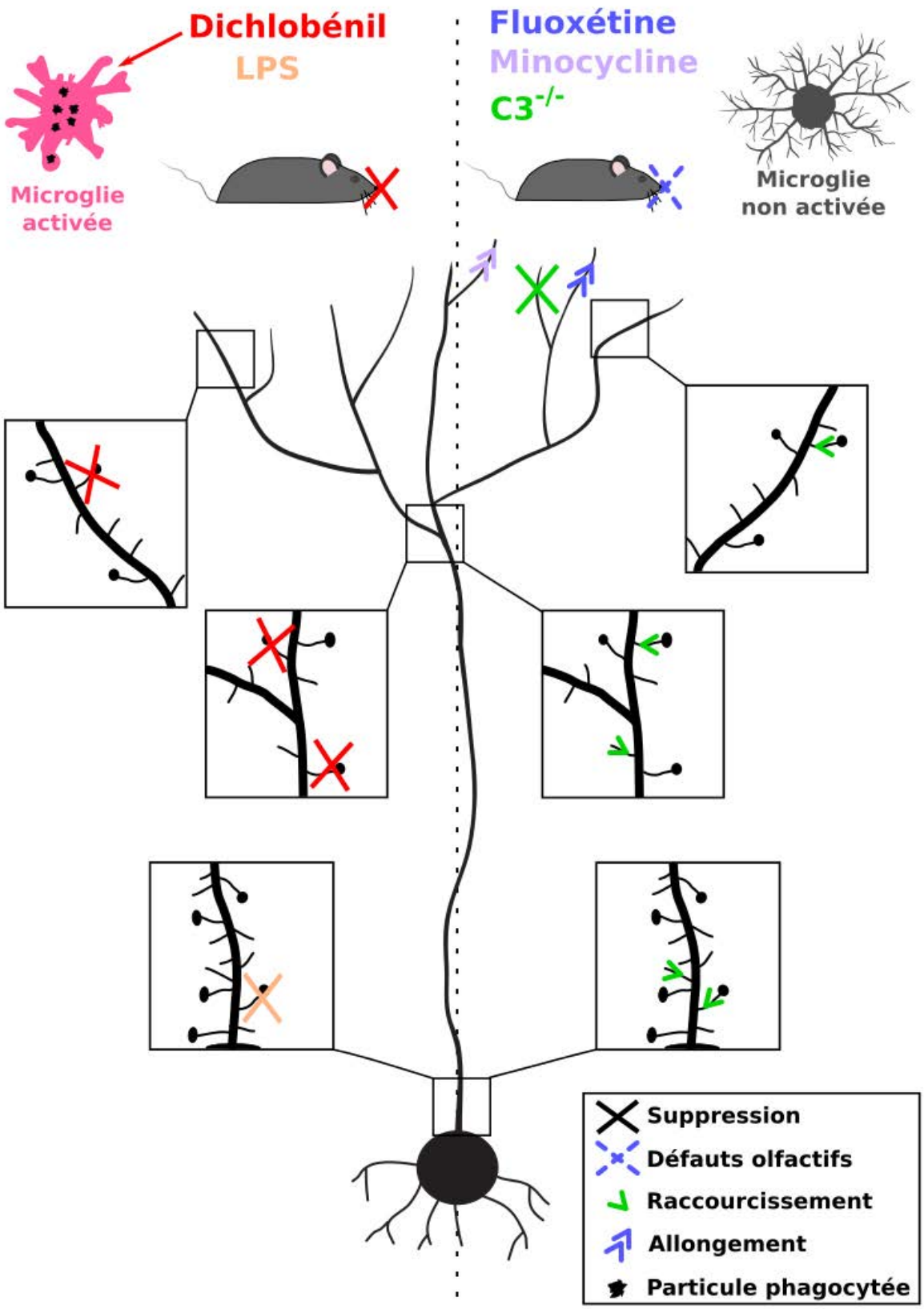


FIGURE IV.1 – Bilan : principaux effets sur l'olfaction et la morphologie des néo-neurones des différents traitements étudiés dans cette thèse.
À gauche, effets du dichlobénil et du LPS ; à droite, effet de la fluoxétine et du génotype $C3^{-/-}$. Les effets montrés ici n'ont pas tous lieu sur des néo-neurones de même âge. Pour plus de détails, voir le texte.

Le génotype C3$^{-/-}$ diminue la complexité dendritique et la longueur des épines des cellules granulaires, sans pour autant toucher à la densité d'épines. Ainsi, contrairement à ce qui a été montré dans la neurogenèse embryonnaire, **l'élagage des néo-neurones du bulbe olfactif adulte pourrait passer par des mécanismes indépendants du complément C3.**

Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour déterminer les modalités de l'interaction entre microglie et cellules granulaires notamment au niveau dynamique (par exemple en utilisant des techniques d'imagerie dynamique telles que la microscopie à 2 photons), et au niveau moléculaire.

Ce travail de thèse montre l'**importance de la microglie dans la régulation du taux de neurogenèse bulbaire en fonction de l'activité sensorielle.** L'implication de la microglie dans les mécanismes de plasticité neuronale ouvre des perspectives de recherche pour des thérapies ciblées sur les cellules microgliales.

Glossaire

6-OHDA 6-Hydroxy-DopAmine, amine neurotoxique pour les neurones dopaminergiques et noradrénergiques, utilisée en injection intracrânienne comme modèle de maladie de Parkinson. 13, 45, 113

acétylcholine Neurotransmetteur central et périphérique impliqué au niveau central dans l'attention, la plasticité et la récompense. Il peut agir sur deux récepteurs : le récepteur muscarinique (couplé à une protéine G), et le récepteur nicotinique (canal ionique). 27, 38

Alzheimer Maladie neurodégénérative qui touche d'abord les neurones hippocampiques puis s'étend au cortex. Les symptômes suivent la progression de la dégénérescence (perte de la mémoire à court terme, puis troubles cognitifs tels que confusion, changement de personnalité ou problèmes de langage). La neurodégénérescence est corrélée à deux marqueurs physiopathologiques : accumulation extracellulaire du peptide Aβ (plaques amiloïdes) et agrégation intracellulaire de neurofibrilles de protéines τ. Cependant, on ne connaît pas à ce jour la cause primaire de la maladie. 12, 44

anhédonie Symptôme médical caractérisé par l'incapacité d'un sujet à ressentir des émotions positives lors de situations de vie pourtant considérées antérieurement comme plaisantes. C'est un des symptômes de la dépression. 53, 94

apoptose Mort cellulaire programmée. Processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. C'est l'une des voies possibles de la mort cellulaire ; elle est physiologique, génétiquement programmée et nécessaire à la survie des organismes multicellulaires. Elle ne provoque pas d'inflammation. 10, 15, 40, 41, 106

astrocyte Cellule gliale aux fonctions très larges (support, nutrition, homéostasie, équilibre synaptique...) ; elle tire son nom de sa forme étoilée. 15, 16, 20, 29–32, 34, 36, 46

B6 C57/BL6, lignée consanguine de souris à pelage sombre obtenue en 1921. C'est la lignée que nous avons utilisée dans toutes les expériences présentées dans la partie *Résultats*. 47, 50, 111

barrière hémato-encéphalique Barrière physiologique présente dans le cerveau entre la circulation sanguine et le système nerveux central. Elle protège le milieu cérébral, grâce à des jonctions serrées entre les cellules endothéliales qui tapissent les capillaires du côté du flux sanguin. 3, 5, 9–12, 112

BrDU Le 5-bromo-2'-deoxyuridine est un nucléoside synthétique analogue à la thymidine. Il est intégré à l'ADN en remplacement de cette dernière durant la mitose, et joue donc le rôle de marqueur de la prolifération cellulaire. 30, 41, 45

bulbe olfactif Structure cérébrale recevant les informations sensorielles olfactives des neurones récepteurs olfactifs, et les relayant au cortex olfactif ; pour une descrip-

tion détaillée de son réseau, voir paragraphe I.C.5.b. 20, 22–28, 31–36, 39, 40, 44–51, 55, 56, 76, 77, 97, 99, 105, 107, 112, 113, 115, 117

bulbe olfactif accessoire Structure située dans la partie dorsalo-postérieure du bulbe olfactif chez la souris. Elle fait partie d'une voie de reconnaissance des molécules chimiques (phéromones principalement) parallèle au système olfactif principal, recevant les informations de l'organe voméronasal – vestigial chez l'être humain – qui perçoit des molécules en phase fluide. 25

^{14}C Carbone radioactif, de nombre de masse 14. Lors des essais nucléaires durant la guerre froide dans les années 1950 et 1960, la quantité de ^{14}C atmosphérique a quasiment doublé. Ce carbone radioactif est entré dans la chaîne alimentaire par fixation de $^{14}CO_2$. Du carbone est intégré dans l'ADN lors de la réplication par mitose, et l'on peut donc dater l'âge d'une cellule post-mitotique car son taux de ^{14}C correspond à celui de l'atmosphère au moment de la mitose qui l'a générée. 46

C1q Facteur du complément 1q, polypeptide composé de 18 sous-unités des trois types (A, B et C) formant un « bouquet » de six immunglobulines capables de se fixer à plus d'une centaine de motifs moléculaires, dont les anticorps IgG et IgM, et des molécules exprimées à la surface des cellules mourantes. 17, 20

C3 Facteur du complément 3, protéine centrale dans la cascade du complément. Elle est activée par clivage, ce qui donne le peptide C3b capable d'opsonisation et le C3a soluble et pro-inflammatoire. 18–20, 47, 49, 50, 92–103, 105, 106, 108–110, 116, 117

CalB La Calbindine-D28k est une protéine de 28 kDa capable de lier le Ca^{2+} dans 4 domaines. Sa présence dans certains interneurones GABAergiques définit la sous-catégorie des interneurones à calbindine. 24, 33, 34

CalR La Calrétinine ou Calbindine-D29k est une protéine de 29 kDa capable de lier le Ca^{2+} dans 6 domaines. Sa présence dans certains interneurones GABAergiques définit la sous-catégorie des interneurones à calrétinine. 24, 34

CD11b *Cluster of Differenciation 11b*, est la sous-unité αM de l'intégrine $\alpha M\beta 2$, qui correspond au CR3; il est exprimé à la surface de nombreux leucocytes, dont les monocytes et les macrophages. Il est impliqué dans la réponse à l'inflammation (adhésion, migration, phagocytose...). 5

CD206 *Cluster of Differenciation 206*, ou récepteur au mannose, est une lectine membranaire des macrophages qui reconnait les peptidoglycanes à la surface des micro-organismes. 8

CD39 *Cluster of Differenciation 39*, ou *Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1*, est une enzyme extracellulaire de surface, qui catalyse l'hydrolyse des résidus β et γ -phosphate des triphospho- et diphosphonucleosides. 6

CD68 *Cluster of Differenciation 68* (ausi appelé ED1), glycoprotéine du lysosome exprimée par les monocytes et macrophages, surexprimée durant l'inflammation. 8, 50

cellule en grain du gyrus dentelé Neurone excitateur glutamatergique situé dans la couche granulaire du gyrus dentelé, qui projette vers CA3 (*Cornu Ammonis* 3, autre région de l'hippocampe) et peut être issu de la neurogenèse adulte hippocampique. 31

cellule en touffe Cellule excitatrice glutamatergique dont le corps cellulaire est situé dans les glomérules du bulbe olfactif, et dont l'axone projette vers le cortex olfactif. 22–27, 37, 48

cellule gliale Toute cellule du système nerveux central qui n'est pas neuronale ni endothéliale : microglie, astrocyte, oligodendrocyte et épendymocyte ; on utilise parfois le nom générique de glie. 15

cellule granulaire Interneurone GABAergique, pouvant provenir de la neurogenèse adulte, dont le corps cellulaire est situé dans la couche des grains du bulbe olfactif. 22, 23, 26–28, 33–41, 48, 51, 55, 56, 98–103, 105–110, 115, 117

cellule mitrale Cellule excitatrice glutamatergique dont le corps cellulaire est situé dans la couche mitrale du bulbe olfactif, et dont l'axone projette vers le cortex olfactif. 22–28, 37, 48, 56

cellule myeloïde Cellule issue de la moelle osseuse, et donc dérivée de cellules souches hématopoïétiques. 3, 4

cellule périglomérulaire Interneurone GABAergique et/ou dopaminergique de la couche glomérulaire du bulbe olfactif, pouvant provenir de la neurogenèse adulte. 22–24, 27, 33–35, 37, 39, 40, 45, 48, 113

cellule souche neurale Cellule souche pluripotente pouvant donner naissance à des neurones, des astrocytes ou des oligodendrocytes ; il s'agit la plupart du temps de glie radiaire. 13, 15, 17, 22, 29–34, 39, 41, 42

cellules souches hématopoïétiques Cellules de la moelle osseuse à l'origine de toutes les cellules circulant dans le sang, notamment les cellules immunitaires dont les monocytes et macrophages. 3–5

centrifuge Qualifie un message neuronal allant du centre (cortex) vers la périphérie. Il module notamment les perceptions sensorielles. Le message en sens inverse est dit centripète. 26–28, 40, 41

centripète Qualifie un message neuronal allant de la périphérie vers les centres intégrateurs (notamment les différents cortex). Le message en sens inverse est dit centrifuge. 41

centrosome Organite non membrané à partir duquel polymérisent tous les microtubules. 35

chimiokine Cytokine de faible poids moléculaire ayant la propriété d'attirer des cellules (chimiotactie), notamment des cellules immunitaires. 7, 8, 11, 12, 42

cholinergique Se dit d'un neurone ou d'une synapse utilisant l'acétylcholine comme neurotransmetteur. 27

cil primaire Organite sensoriel (non moteur) qui forme une unique et fine protubérance depuis le corps cellulaire ; son échafaudage formé de microtubules sert d'ancrage à de nombreuses molécules, notamment des moteurs moléculaires qui transportent des protéines le long du cil. 33

CMH Compexe Majeur d'Histocompatibilité, système de reconnaissance du soi exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigène. 8

complément Ensemble d'enzymes (C1 à C9) protéolytiques appartenant au système immunitaire inné et adaptatif, pouvant s'activer en cascade. Le C3 est à la croisée des trois voies d'activation de la cascade. 16, 17, 19, 20, 47, 49, 94–97, 102, 103, 105, 106, 108–110, 117

cône de croissance Extension dynamique d'un neurone en migration, ou d'un neurite en développement ; il est sensible aux molécules chimioattractives et chimiorépulsives, ainsi qu'à la matrice extracellulaire. 34, 35

cortex olfactif Ensemble de parties du cortex cérébral impliquées dans le traitement des informations olfactives en provenance de bulbe olfactif, comprenant notamment le cortex piriforme et le noyau olfactif antérieur. 23–27

cortex orbitofrontal Partie du cortex préfrontal qui intègre de nombreuses informations sensorielles et est impliquée dans la prise de décision. Il tire son nom des lobes frontaux et du fait qu'il est situé au-dessus des orbites. 26, 28

cortex piriforme Paléocortex à trois couches, recevant des entrées du bulbe olfactif et du tractus olfactif latéral. 24–28

corticostérone Principale hormone glucocorticoïde chez la souris. 76, 77, 106, 108

couche des grains Couche du bulbe olfactif contenant les corps cellulaires des cellules granulaires. 23, 26–28, 33–37, 48, 107, 108

couche glomérulaire Couche du bulbe olfactif contenant les glomérules. 23, 26–28, 34, 35, 48–50

couche mitrale Couche du bulbe olfactif contenant les corps cellulaires des cellules mitrales. 22, 23, 34, 36, 48

couche plexiforme externe Couche du bulbe olfactif contenant peu de corps cellulaires située entre la couche mitrale et la couche glomérulaire. 22, 23, 28, 34, 36, 37, 40, 48

couche plexiforme interne Couche du bulbe olfactif contenant peu de corps cellulaires située entre la couche des grains et la couche mitrale. 23, 27, 34, 48

courant de migration rostral Voie de migration tangentielle des neuroblastes nés dans la zone sous-ventriculaire et se rendant dans le bulbe olfactif. 23, 28, 31, 33–37, 39, 46, 51, 98, 108

CR3 Récepteur au complément 3, peut fixer iC3. 97

CSF-1R *Colony Stimulating Factor 1 Receptor* est le récepteur à une cytokine sécrétée qui induit la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en macrophages. C'est également un facteur de survie de la microglie. 6, 16

CX3CR1 Protéine transmembranaire couplée à une protéine G, récepteur de la chimiokine CX3CL1 ou fractalkine, exprimée par les lymphocytes et les monocytes. 4, 6, 13, 15–17, 50, 109

cytokine Protéine ou glycoprotéine de signalisation cellulaire synthétisée par des cellules (notamment les cellules du système immunitaire), agissant à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. 7, 8, 10–13, 33, 41–43, 47

Dcx La doublecortine est une protéine associée aux microtubules exprimée par les progéniteurs neuronaux en division et les neuroblastes. Elle est d'ailleurs souvent utilisée comme marqueur moléculaire des neurones immatures. 35, 36, 41, 46

déafférentation Coupure de l'innervation d'une structure nerveuse. Dans le cas du bulbe olfactif , il s'agit de la coupure de l'entrée sensorielle provenant de l'épithélium olfactif *via* le nerf olfactif. 47, 48, 55–57, 105–109

dérivé réactif de l'oxygène Espèce chimique oxygénée rendue chimiquement très réactive par la présence d'électrons de valence non appariés (par exemple l'anion

superoxyde O_2^-, l'oxygène singulet O_2^*, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2, ou l'ozone O_3). Les dérivés réactifs de l'oxygène peuvent être d'origine exogène — produits par des rayonnements ionisants par exemple — ou bien endogènes, apparaissant comme sous-produits du métabolisme normal de l'oxygène et jouant alors un rôle important dans la communication entre les cellules. Ils deviennent cependant cytotoxiques à forte concentration (stress oxydatif). 7, 42

dichlobénil 2,6-dichlorobenzonitrile, herbicide aujourd'hui interdit ayant une forte toxicité pour les glandes de Bowman de l'épithélium olfactif. Il provoque la nécrose des neurones récepteurs olfactifs et la dégénérescence du nerf olfactif (déafférentation du bulbe olfactif), ce qui résulte en une forte inflammation dans le bulbe olfactif. 47, 48, 55, 56, 106–109, 115, 116

diencéphale Partie du système nerveux central en développement, à l'origine des vésicules optiques et des ganglions de la base. 29

dopamine Neurotransmetteur et neuromodulateur appartenant aux catécholamines, issu de l'acide aminé tyrosine, notamment *via* l'enzyme TH. Ce neuromodulateur joue un rôle essentiel dans des processus moteurs et cognitifs. La perte des neurones dopaminergiques de la substance noire entraine les troubles moteurs de la maladie de Parkinson. 24

dopaminergique Se dit d'un neurone ou d'une synapse utilisant la dopamine comme neurotransmetteur. 13, 16, 24, 33, 36, 39, 45, 113

élagage Suppression de parties neuronales (synapses, axones ou dendrites). C'est un processus physiologique important lors de développement des neurones. Il peut être interne au neurone (rétraction), ou bien externe, notamment par phagocytose par la microglie. 14, 16, 47, 55–57, 97, 105, 108, 109, 115, 117

énantiomère Deux molécules sont énantiomères l'une de l'autre lorsqu'elles possèdent les mêmes groupements chimiques et sont l'image l'une de l'autre dans un miroir. On distingue les énantiomères par leur propriété de dévier la lumière polarisée de manière différente : on note (+) celui qui dévie la lumière vers la droite, (-) celui qui la dévie vers la gauche. 21

enrichissement Augmentation de la richesse du milieu des animaux d'élevage pour mieux reproduire le milieu naturel. Il n'existe pas de méthode universelle d'enrichissement : il peut passer par l'introduction de coton pour faire un nid, de jeux et d'objets aux formes variées, de roues... Pour l'enrichissement olfactif, les animaux sont mis en présence d'odeurs variées renouvelées régulièrement. 40, 42, 112

épendymocyte Cellule épithéliale qui tapisse la surface du ventricule : elle est à l'interface entre le liquide cérébro-spinal et le système nerveux central. C'est l'un des quatre types de cellules gliales. 30, 33

épine Protrusion d'une dendrite, formant la partie post-synaptique (receveuse) d'un contact synaptique. 36, 37, 39, 40, 51, 56, 57, 99–103, 108–110, 117

épithélium olfactif Muqueuse de la cavité nasale, contenant les neurones récepteurs olfactifs ; il est bien distinct de l'épithélium respiratoire, situé plus en avant dans la cavité nasale. 21–23, 47–49, 76, 77, 112

extrinsèque Se dit d'un facteur déterminant le sort d'une cellule qui est présent dans l'environnement de la cellule, mais qui ne dépend pas de son lignage : une cellule greffée dans cet environnement perd ses caractéristiques propres et acquiert celles des cellules qui l'entourent. 35, 39

F4/80 Protéine membranaire d'adhésion appartenant à la famille des protéines couplées à la protéine G, exprimée chez la souris par les macrophages. 6

ficoline Lectine oligomérique reconnaisant les N-acétyl-glucosamines et pouvant initier la cascade du complément. 19

fluoxétine Inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine, couramment utilisé notamment pour traiter la dépression (sous le nom commercial de Prozac). 43, 76, 77, 106–108, 113, 115, 116

fractalkine chimiokine chemoattractante pour les monocytes dans sa version sécrétée, et qui permet l'adhésion et la migration dans sa forme membranaire; elle est produite par les neurones du système nerveux central. 4, 17, 50

GABA *γ-aminobutyric acid* ou acide γ-aminobutyrique, principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central chez les mammifères adultes. 27, 38

GABAergique Se dit d'un neurone ou d'une synapse utilisant le GABA comme neurotransmetteur. 22, 24, 27, 39

GFAP La protéine acide fibrillaire gliale, ou *Glial Fibrillary Acidic Protein* est un marqueur moléculaire des astrocytes. Elle est cependant exprimée par plusieurs autres types cellulaires dans le système nerveux central, comme les épendymocytes. 32, 34

GFP *Green Fluorescente Protein* ou protéine fluorescente verte, protéine à fluorochrome provenant d'une méduse, dont l'expression peut être génétiquement induite pour marquer une protéine ou une cellule d'intérêt. 5, 50, 51

glande de Bowman Glande sécrétrice de mucus, située dans l'épithélium olfactif. 22, 47, 48

glie radiaire cellule bipolarisée présente dans le système nerveux central en développement et dans les niches neurogéniques à l'âge adulte. La glie radiaire est de nature astrocytaire (elle exprime le marqueur moléculaire GFAP, typique des astrocyte) et donne naissance aux progéniteurs neuronaux, mais aussi éventuellement à des astrocyte et oligodendrocyte. Elle doit son nom à sa forme : lors de la neurogenèse embryonnaire, les neuroblastes migrent le long de son prologement. 29–31, 34

glomérule Structure du bulbe olfactif où convergent les axones des neurones récepteurs olfactifs et les dendrites des cellules mitrales. 22–24, 26

glucocorticoïde Groupe d'hormones produites par la glande surrénale (faisant partie de l'axe HPA), de manière circadienne ou lors d'un événement stressant. Un pic aigu de glucocorticoïdes est anti-inflammatoire, mais peut devenir pro-inflammatoire en chronique, notamment lors d'un stress chronique. L'apport chronique de glucocorticoïdes exogènes peut d'ailleurs être utilisé comme modèle de dépression. Chez l'être humain la principale hormone glucocorticoïde est le cortisol ; son équivalent chez la souris est la corticostérone. 8, 12, 43, 76

glutamatergique Se dit d'un neurone ou d'une synapse utilisant le glutamate comme neurotransmetteur. 23, 28, 29, 41

gyrus dentelé Structure de l'hippocampe aussi appelée gyrus denté. 17, 20, 28, 30, 31, 41–43, 46, 76, 77

hippocampe Structure du cerveau située sous le cortex, impliquée dans la mémoire et la navigation spatiale. Il contient entre autres le gyrus dentelé, siège de neurogenèse adulte . 8, 30, 31, 41, 43–46, 57, 113

homéostasie Phénomène par lequel un facteur clé (par exemple, le taux de glucose) est maintenu autour d'une valeur bénéfique pour le système considéré, grâce à un processus de régulation. Plus globalement, l'homéostasie est la capacité d'un organisme à maintenir tout un ensemble de facteurs clés autour d'une valeur de référence. 10, 14, 33

HPA Axe Hypothalamus-Pituitaire-Adrénal, axe hormonal complexe dont les hormones se régulent les unes les autres (directement ou par rétrocontrôle). Il joue notamment un rôle important dans la réponse au stress. 43, 76, 77

hypothalamus Structure du cerveau située sur la face ventrale de l'encéphale. Il est constitué de plusieurs sous-structures, appelées noyaux, qui assurent diverses fonctions. Il assure notamment un important rôle endocrine. 30

Iba-1 *Ionized calcium-binding adapter molecule 1*, aussi appelée *Allograft inflammatory factor 1* (AIF-1), protéine exprimée par les macrophages et les monocytes ; dans le cerveau, elle marque spécifiquement la microglie (sauf en cas d'invasion de cellules immunitaires périphériques, voir page 12) et est surexprimée lorsque la microglie est activée. 6, 50, 105

IGF *Insulin-like Growth Factor*, facteur de croissance ressemblant à l'insuline, important pour de nombreux processus physiologiques. 15, 42

IL Interleukine, molécule de communication entre cellules immunitaires (cytokine) ayant d'abord été décrite dans les leucocytes. 7, 8, 11–13, 15, 17, 41–44

inflammation Réaction de défense immunitaire stéréotypée en réponse à une agression externe (infection, traumatisme, brûlure, allergie, *etc*) ou interne (cellules cancéreuses) faisant intervenir 4 phénomènes : élévation des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, activation de macrophages, recrutement de leucocytes et dommages tissulaires locaux. 8, 11–13, 19, 41–45, 47, 56, 111

iNOS Enzyme inductible de synthèse de l'oxyde nitrique. 7

interféron-γ Cytokine pro-inflammatoire notamment impliquée dans la réponse aux infections virales, en empêchant la réplication du virus dans les cellules-hôtes. 7, 8, 43, 44

interneurone Neurone ayant des prolongements à faible distance : généralement, les interneurones ont tous leurs dendrites et leur axone contenus dans la même structure du système nerveux central. Par exemple, les interneurones du bulbe olfactif ont tous leurs dendrites contenus dans le bulbe olfactif. La plupart sont inhibiteurs et utilisent le GABA comme neurotransmetteur. 22, 23, 29, 30, 34, 40, 47, 48, 55

intrinsèque Se dit d'un facteur déterminant le sort d'une cellule qui n'est pas modifié par l'environnement de la cellule, mais qui dépend seulement de son lignage : cette cellule greffée dans un contexte différent ne change pas de destinée. 35, 38

IRM Imagerie par Résonnance Magnétique, méthode d'imagerie cérébrale fondée sur la résonnance magnétique nucléaire et permettant de visualiser le cerveau en 3 dimensions. Il existe des appareils d'IRM adaptés aux organismes modèles, notamment aux rongeurs. 43, 113

lame basale Assemblage de protéines et glycoprotéines extracellulaires sur lequel reposent les cellules épithéliales. Les molécules constitutives de la lame basale sont sécrétées par les cellules épithéliales. 32, 33

lectine Protéine qui se lie spécifiquement et de façon réversible à certains glucides. Les lectines ont un rôle dans l'immunité, soit sous forme membranaire comme le CD206, soit sous forme sécrétée comme la MBL et les ficolines dans la voie des lectines du complément. 19

leucocyte Aussi appelés globules blancs, les leucocytes sont les cellules immunitaires circulant dans le sang. 1, 4, 11

lignage cellulaire Méthode permettant d'établir l'origine embryonnaire d'un tissu adulte, en marquant des cellules à un stade embryonnaire (grâce à un colorant, ou par des méthodes génétiques qui sont transmises par mitose), et en analysant leur progéniture à un stade plus avancé de développement. 4

liquide cérébro-spinal Le liquide cérébro-spinal est le fluide dans lequel baigne le système nerveux central. Il est secrété dans le cerveau par les plexus choroïdes au niveau des ventricules. 33

LPS Lipoposysaccharide, molécule de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, composée d'un lipide et d'un polysacharide liés de manière covalente. Il est reconnu par des récepteurs de l'immunité innée tels que des TLR et provoque chez les mammifères une forte réaction pro-inflammatoire. 8, 13, 15, 41, 42, 47–50, 56, 92–103, 105, 106, 108, 109, 111, 115, 116

LTP Potentiation à long terme, augmentation durable de la transmission synaptique déclenchée par une suite particulière de stimulations de la synapse en question. 11

M1 État d'activaton « classique » de la microglie correspondant à l'expression principale de cytokines pro-inflammatoires. 7, 8, 11, 12, 41

M2 État d'activaton « alternative » de la microglie correspondant à l'expression principale de cytokines anti-inflammatoires. 7, 8, 41

MAC *Membrane Attack Complex*, canal membranaire formé de la polymérisation du complément C9 fixé au complexe C5-6-7-8 et provoquant la lyse de la cellule par entrée osmotique d'eau. 19

macrophage Cellule immunitaire phagocytaire, résidente dans un tissu, et ayant des propriétés spécifiques selon le tissu ; elle est issue des monocytes circulants. 3–8, 10, 32

macrophage périvasculaire Macrophage résidant dans le système nerveux central, proche des vaisseaux sanguins et des cappillaires. 5, 6

marqueur moléculaire Molécule (le plus souvent protéique ou glycoprotéique) exprimée spécifiquement par un type cellulaire donné, ou dans des conditions données. Par exemple Iba-1 est un marqueur moléculaire des monocytes et macrophages, et CD68 un marqueur des monocytes et macrophages activés. 5, 6, 45, 46

MBL *Mannose-Binding Lectin*, lectine sécrétée pouvant initier la cascade du complément lorsqu'elle se fixe au mannose. Sa structure est très proche du C1q, mais peut se présenter sous plusieurs formes oligomériques (trimères, tétramères et plus). 19

méninges membranes entourant le système nerveux central. 11

mésencéphale Partie médiane du système nerveux central en développement, à l'origine du tegmentum et du tectum. 29

métencéphale Partie du système nerveux central en développement, à l'origine du cervelet. 29

microglie Macrophage résidant dans le système nerveux central, plus précisément dans le parenchyme; elle est caractérisée au repos par une forme très ramifiée. 1–17, 20, 41–44, 46–48, 50, 55–57, 97, 103, 105–109, 112, 113, 115, 117

minocycline Antibiotique à large spectre couramment utilisé pour ses propriétés anti-inflammatoires sur la microglie. 15, 49, 55, 56, 106, 107, 109, 115

monocyte Cellule immunitaire phagocytaire circulante ; elle peut se différencier en macrophage dans divers tissus. 3–6

myélencéphale Partie postérieure du système nerveux central en développement, à l'origine du tronc cérébral. 29

myélinisation Processus par lequel les axones des neurones sont entourés d'une gaine de myéline : les oligodendrocyte enroulent leur membrane riche en myéline autour des axones. La vitesse de conduction de l'influx nerveux le long de l'axone est augmentée par la myélinisation. 14, 16

néo-neurone Neurone né à l'âge adulte, lors de la neurogenèse adulte. 20, 23, 27, 30–33, 35–42, 44, 46–48, 51, 55–57, 76, 77, 97–99, 101, 103, 105–110, 112, 115–117

nerf olfactif Ensemble des axones des neurones récepteurs olfactifs qui projettent de l'épithélium olfactif au bulbe olfactif. 23, 24, 26, 27, 47, 48

neuroblaste Cellule immature destinée à se différencier en neurone. 17, 20, 23, 29, 31–37, 39, 44, 46

neurogenèse adulte Ensemble des processus de création de nouveaux neurones fonctionnels – appelés néo-neurone – au sein du système nerveux central à l'âge adulte ; elle a principalement lieu dans trois zones du cerveau chez le rongeur : la zone sous-ventriculaire, le gyrus dentelé et l'hypothalamus. 17, 20, 22, 27–30, 37, 41–47, 49, 55, 56, 76, 77, 105–107, 109, 112, 113, 115

neurogenèse embryonnaire Ensemble des processus de création de neurones fonctionnels à partir d'une cellule souche neurale, lors du développement du système nerveux central chez l'embryon. 15, 29, 33, 37, 56, 109, 117

neuroinflammation Inflammation ayant lieu dans le système nerveux central. Elle présente les 4 caractéristiques de l'inflammation, avec rupture obligatoire de la barrière hémato-encéphalique et entrée de leucocytes périphériques. Elle peut être déclenchée par un traumatisme crânien, une ischémie ou une infection dans le système nerveux central. Par extension, ce terme est souvent employé dès lors que des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires sont exprimées et/ou que la microglie est activée. 10–12

neurone récepteur olfactif Neurone de l'épithélium olfactif aussi appelé neurone sensoriel olfactif, exprimant un unique type de récepteur olfactif, responsable de la transduction du message chimique (fixation d'une molécule odorante sur le récepteur olfactif) en message électrique le long de son axone ; l'ensemble des axones des neurones récepteurs olfactifs forme le nerf olfactif qui projette sur le bulbe olfactif au niveau des glomérules. 21–23, 26, 39, 47, 48, 77

NF-κB *Nuclear Factor κB*, complexe de protéines jouant le rôle de facteur de transcription, exprimé de façon quasiment ubiquitaire par les cellules des mammifères, et impliqué dans de nombreux processus immunitaires (notamment dans la réponse à l'inflammation) ou non (plasticité synaptique). 8, 15

niche neurogénique Structure ayant des caractéristiques physico-chimiques particulières permettant le maintien et la prolifération de cellules souches neurales. 30, 32

NKCC1 Transporeur ionique transmembranaire faisant activement entrer des ions Cl^- et sortir le K^+ dans la cellule grâce à la force du gradient Na^+ (lui-même généré par la Na^+/K^+ ATPase). Il provoque l'accumulation de Cl^- intracellulaire.). 35, 36

NOD *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*, récepteur immunitaire impliqué dans l'immunité innée. 7

noradrénaline Neurotransmetteur et hormone, aussi appelé norépinéphrine. Dans le système nerveux central elle est produite principalement par les neurones du *locus cœruleus* dans le tronc cérébral. 26, 38

noradrénergique Se dit d'un neurone ou d'une synapse utilisant la noradrénaline comme neurotransmetteur. 26

noyau olfactif antérieur Partie la plus rostrale du cortex olfactif. 24–27

oligodendrocyte cellule gliale dont la membrane s'enroule autour des axones des neurones, pour former une gaine de myeline qui augmente la vitesse de conduction du signal électrique. 2, 15, 29

opsonisation Processus biochimique par lequel une molécule (dite opsonine) recouvre la membrane d'une cellule cible (un micro-organisme ou une cellule du corps infectée par un pathogène) pour favoriser sa phagocytose par une cellule dotée de récepteurs pour les opsonines. Les anticorps et le complément C3b sont des opsonines. 18, 19

PAMP Un motif moléculaire associé aux pathogènes ou *Pathogene Associated Molecular Pattern* est une molécule produite par des pathogènes (bactéries, virus, champignons, parasites...), reconnue par le système immunitaire inné et provoquant une réaction pro-inflammatoire. Par exemple, le LPS est un PAMP reconnu par des récepteurs TLR. 11

parabiose Méthode qui consiste à relier deux animaux chirurgicalement par leur péritoine, de sorte qu'ils partagent la même circulation sanguine. 4, 5

Parkinson Maladie neurodégénérative touchant les neurones dopaminergiques (notamment dans la substance noire), associée avec des agrégats intracellulaires de protéine α-synucléine (corps de Lewy). Les signes cliniques typiques (tremblement de repos, akynésie et hypertonie musculaire extrapyramidale) sont dus à la perte des neurones de la substance noire, ce qui provoque la dérégulation du circuit des ganglions de la base ; mais ces signes moteurs peuvent être précédés de signes précliniques peu discriminants (troubles du sommeil, constipation, perte olfactive) liés à la perte des autres neurones dopaminergiques. 12, 13, 44, 45, 113

phagocytose Processus cellulaire par lequel certaines cellules peuvent ingérer des particules étrangères solides d'échelle micrométrique. La phagocytose est induite par le contact physique avec la particule-cible, de taille supérieure à 0,5 μm. 10, 13, 15–17, 19, 20, 56, 57

plasticité Ensemble des mécanismes par lesquels le cerveau est capable de se modifier physiquement et fonctionnellement. Elle peut apparaître à plusieurs échelles : du sub-cellulaire (modification des synapses), au réseau (ajout par neurogenèse ou retrait par mort cellulaire de neurones au réseau). La plasticité neuronale permet l'apprentissage et l'adaptation des êtres vivants. À l'âge adulte, la neurogenèse adulte est une composante clef de la plasticité cérébrale. 113, 115

poisson zèbre Animal modèle couramment utilisé, notamment en biologie du développement. Sa larve transparente permet de l'imagerie *in toto*. 4, 10

progéniteur neuronal Cellule neuronale pouvant se diviser un nombre fini de fois et donner naissance à des neurones. 29–32

proneurogénique Qui favorise la neurogenèse. 17, 42

PSA-NCAM La Polysialated Neural Cell Adhesion Molecule est primordiale dans la migration des neuroblastes : l'ajout d'un groupement acide polysialique (PSA) à la protéine membranaire d'adhésion NCAM empêche l'adhérence du neuroblaste en migration avec son environnement. 35, 36, 46

PSD95 *Post-Synatic Density 95*, protéine associée à la membrane participant à l'échafaudage des densités post-synaptiques des synapses excitatrices glutamatergiques. 41

PU.1 Facteur de transcription important dans le développement de la lignée des monocytes et des lymphocytes B. 16

récepteur éboueur Récepteur impliqué dans l'immunité innée, qui reconnait et dégrade des lipoprotéines situées sur la surface des micro-organismes. 7

récepteur olfactif Protéine transmembranaire (récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G) ayant une affinité pour une gamme de molécules odorantes, dont la fixation provoque une cascade moléculaire qui *in fine* donne un message électrique dans le nerf olfactif. L'ensemble des gènes des récepteurs olfactifs forme une famille multigénique de plusieurs centaines de gènes. 21, 22, 24, 112

reeline Protéine cruciale pour la régulation des processus de migration neuronale pendant le développement cérébral, ainsi que durant la neurogenèse adulte. 35

rhombencéphale Partie postérieure du système nerveux central en développement, à l'origine métencéphale myélencéphale. 15

Robo Famille de protéines membranaires (*Roundabout*, 4 homologues) réceptrices aux protéines sécrétées Slit : suite à la fixation, une cascade moléculaire aboutit à l'activation de plusieurs effecteurs qui contrôlent la motilité cellulaire. 35, 36

sac vitellin Structure péri-embryonnaire issue de l'endoderme et du mésoderme, qui fournit les premières cellules macrophagiques à l'embryon. 4

sérotonine Neurotransmetteur aussi appelé 5-hydroxytryptamine (5-HT), produit par les neurones sérotoninergiques du noyau du raphé dans le tronc cérébral. Il est impliqué dans les troubles de l'humeur, dont la dépression. 26, 38, 44, 76, 107

sérotoninergique Se dit d'un neurone ou d'une synapse utilisant la sérotonine comme neurotransmetteur. 26, 107

sickness behavior Ensemble de comportements induit par une inflammation périphérique, comprenant fièvre, lassitude, léthargie, manque d'appétit et diminution des interactions sociales. 12, 92, 93, 95, 109

Slit Famille de protéines sécrétées (il existe 3 homologues) chemorepulsives lorsqu'elles se fixent à leur récepteur Robo. 35, 36

Sonic Hedgehog Protéine sécrétée jouant un rôle important dans la communication intercellulaire durant le développement ; à l'âge adulte, elle attire les neuroblastes en migration dans la RMS. 35, 36

STAT *Signal Transducer and Acivator of Transcription* est une famille de protéines facteurs de transcription intracellulaires, notamment impliqués dans des cascades de réponses immunitaires. 8

substance blanche Partie du système nerveux central composée majoritairement de faisceaux d'axones (par opposition à la substance grise). La myéline entourant les axones lui confère sa couleur blanche. Dans le cerveau, elle est principalement située sous le cortex et le corps calleux, lieu de passage des axones d'un hémisphère cérébral à l'autre, en est un composant majeur. 9

substance grise Partie du système nerveux central composée majoritairement de corps cellulaires neuronaux (par opposition à la substance blanche). 9

substance noire Noyau du mésencéphale dont le nom provient de sa couleur noire due à la présence du pigment neuromélanine. La perte des neurones dopaminergiques de la substance noire entraine les troubles moteurs de la maladie de Parkinson. 13, 44, 45

système nerveux central Partie du système nerveux comprenant le cerveau et la moelle épinière, baignée dans le liquide cérébro-spinal et isolée du reste du corps par la barrière hémato-encéphalique. 3, 5, 6, 8–13, 19, 28, 29, 45, 49, 112, 113

télencéphale Partie la plus antérieure du système nerveux central en développement, à l'origine du cortex. 9, 29

TGFβ *Transforming Growth Factor* β, facteur de croissance polypetidique, ayant un rôle anti-inflamatoire. 8, 20, 41

TH Tyrosine Hydroxylase, enzyme oxydoréductrice qui catalyse l'étape limitante de la synthèse de dopamine (L-dopa). 16, 24, 39

TLR *Toll-Like Receptor*, récepteur immunitaire impliqué dans l'immunité innée. TLR2 et TLR4 reconnaissent notamment le LPS. 7

TNF-α *Tumor Necrosis Factor-*α, cytokine pro-inflammatoire de phase aiguë sécrétée principalement par les macrophages activés, mais pouvant être produite par de nombreux autres types cellulaires (dont les neurones). 7, 11, 12, 15, 41–44

tractus olfactif faisceau constitué par les axones des cellules mitrales et cellules en touffe en route vers le cortex olfactif. 25–28

ventricule Cavité du cerveau où est produit et circule le liquide cérébro-spinal. Il est tapissé de cellules épithéliales particulières : les épendymocytes. 9, 29–32

zone sous-granulaire Niche neurogénique à l'origine des néo-neurones de l'hippocampe. 20, 30, 31, 42

zone sous-ventriculaire Structure cérébrale située au bord des deux ventricules latéraux. C'est l'un des sièges de la neurogenèse adulte dans de nombreuses espèces animales. Chez le rongeur, les neuroblastes générés dans la zone sous-ventriculaire migrent *via* le courant de migration rostral jusqu'au bulbe olfactif où ils s'intègrent. 15, 17, 20, 30–35, 37, 39, 42, 45, 46, 77, 108, 112

Bibliographie

J. Aarum, K. Sandberg, S. L. B. Haeberlein, and M. A. A. Persson. Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26):15983–15988, Dec. 2003. 18

A. K. Abbas, A. H. H. Lichtman, and S. Pillai. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. Elsevier Health Sciences, Oct. 2015. pages 36-37, 159-165. 19

B. Ajami, J. L. Bennett, C. Krieger, W. Tetzlaff, and F. M. V. Rossi. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature Neuroscience*, 10(12):1538–1543, Dec. 2007. 5

J. J. Alexander, A. J. Anderson, S. R. Barnum, B. Stevens, and A. J. Tenner. The complement cascade: Yin-Yang in neuroinflammation–neuro-protection and -degeneration. *Journal of Neurochemistry*, 107(5):1169–1187, Dec. 2008. 19

M. Alonso, C. Viollet, M.-M. Gabellec, V. Meas-Yedid, J.-C. Olivo-Marin, and P.-M. Lledo. Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(41):10508–10513, Oct. 2006. 42

M. Alonso, I. Ortega-Pérez, M. S. Grubb, J.-P. Bourgeois, P. Charneau, and P.-M. Lledo. Turning astrocytes from the rostral migratory stream into neurons: a role for the olfactory sensory organ. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(43):11089–11102, Oct. 2008. 37, 41

M. Alonso, G. Lepousez, W. Sebastien, C. Bardy, M.-M. Gabellec, N. Torquet, and P.-M. Lledo. Activation of adult-born neurons facilitates learning and memory. *Nature neuroscience*, 15(6):897–904, June 2012. 60

J. Altman. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 135(3509): 1127–1128, 1962. 30

J. Altman. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *The Anatomical Record*, 145(4):573–591, 1963. 30

J. Altman. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *The Journal of Comparative Neurology*, 137(4):433–457, Dec. 1969. 30

J. Altman and G. D. Das. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of comparative neurology*, 124(3):319–335, June 1965. 30, 49

A. Alvarez-Buylla and D. A. Lim. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*, 41(5):683–686, Mar. 2004. 33, 34

A. Alvarez-Buylla, J. M. García-Verdugo, and A. D. Tramontin. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(4):287–293, Apr. 2001. 36

J. A. J. Alves, P. Barone, S. Engelender, M. M. Fróes, and J. R. L. Menezes. Initial stages of radial glia astrocytic transformation in the early postnatal anterior subventricular zone. *Journal of Neurobiology*, 52(3):251–265, Sept. 2002. 37

S. Amor, L. A. N. Peferoen, D. Y. S. Vogel, M. Breur, P. van der Valk, D. Baker, and J. M. van Noort. Inflammation in neurodegenerative diseases–an update. *Immunology*, 142(2): 151–166, June 2014. 99

I. Amrein. Adult hippocampal neurogenesis in natural populations of mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(5), May 2015. 30

C. Anacker, P. A. Zunszain, L. A. Carvalho, and C. M. Pariante. The glucocorticoid receptor: Pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology*, 36(3): 415–425, Apr. 2011. 46

J. B. Angevine and R. L. Sidman. Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. 1961. 31

E. Angot, K. Loulier, K. T. Nguyen-Ba-Charvet, A.-P. Gadeau, M. Ruat, and E. Traiffort. Chemoattractive activity of sonic hedgehog in the adult subventricular zone modulates the number of neural precursors reaching the olfactory bulb. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 26 (9):2311–2320, Sept. 2008. 37

E. S. Anton, H. T. Ghashghaei, J. L. Weber, C. McCann, T. M. Fischer, I. D. Cheung, M. Gassmann, A. Messing, R. Klein, M. H. Schwab, K. C. K. Lloyd, and C. Lai. Receptor tyrosine kinase ErbB4 modulates neuroblast migration and placement in the adult forebrain. *Nature Neuroscience*, 7(12):1319–1328, Dec. 2004. 37

J. M. Antony, A. Paquin, S. L. Nutt, D. R. Kaplan, and F. D. Miller. Endogenous microglia regulate development of embryonic cortical precursor cells. *Journal of neuroscience research*, 89(3):286–298, Mar. 2011. 14

P. M. Aponso, R. L. M. Faull, and B. Connor. Increased progenitor cell proliferation and astrogenesis in the partial progressive 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 151(4):1142–1153, Feb. 2008. 48

B. R. Arenkiel, H. Hasegawa, J. J. Yi, R. S. Larsen, M. L. Wallace, B. D. Philpot, F. Wang, and M. D. Ehlers. Activity-induced remodeling of olfactory bulb microcircuits revealed by monosynaptic tracing. *PloS One*, 6(12):e29423, 2011. 43

A. P. Arnold, X. Chen, J. C. Link, Y. Itoh, and K. Reue. Cell-autonomous sex determination outside of the gonad. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 242(4):371–379, Apr. 2013. 115

L. Asarian and N. Geary. Sex differences in the physiology of eating. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 305(11):R1215–R1267, Dec. 2013. 115

V. Babes. Sur certains caractères des lesions histologiques de la rage. *Ann Inst Pasteur Lille*, 6:209–223, 1892. 2

A. D. Bachstetter, J. M. Morganti, J. Jernberg, A. Schlunk, S. H. Mitchell, K. W. Brewster, C. E. Hudson, M. J. Cole, J. K. Harrison, P. C. Bickford, and C. Gemma. Fractalkine and CX 3 CR1 regulate hippocampal neurogenesis in adult and aged rats. *Neurobiology of Aging*, 32(11):2030–2044, Nov. 2011. 18

J. Bakker and M. J. Baum. Role for estradiol in female-typical brain and behavioral sexual differentiation. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29(1):1–16, Jan. 2008. 115

S. Baraldi, N. Hepgul, V. Mondelli, and C. M. Pariante. Symptomatic treatment of interferon-α-induced depression in hepatitis C: a systematic review. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 32(4):531–543, Aug. 2012. 47

T. Barichello, J. S. Generoso, L. R. Simões, J. A. Goularte, F. Petronilho, P. Saigal, M. Badawy, and J. Quevedo. Role of Microglial Activation in the Pathophysiology of Bacterial Meningitis. *Molecular Neurobiology*, 53(3):1770–1781, Apr. 2016. 12

D. S. Barry, J. M. P. Pakan, and K. W. McDermott. Radial glial cells: key organisers in CNS development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 46:76–79, Jan. 2014. 31

P.-O. Bastien-Dionne, L. S. David, A. Parent, and A. Saghatelyan. Role of sensory activity on chemospecific populations of interneurons in the adult olfactory bulb. *The Journal of Comparative Neurology*, 518(10):1847–1861, May 2010. 42

S. A. Bayer. Changes in the total number of dentate granule cells in juvenile and adult rats: a correlated volumetric and 3h-thymidine autoradiographic study. *Experimental Brain Research*, 46(3):315–323, 1982. 30

S. A. Bayer, J. W. Yackel, and P. S. Puri. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science (New York, N.Y.)*, 216(4548): 890–892, May 1982. 30

K. Belarbi, C. Arellano, R. Ferguson, T. Jopson, and S. Rosi. Chronic neuroinflammation impacts the recruitment of adult-born neurons into behaviorally relevant hippocampal networks. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(1):18–23, Jan. 2012. 44

R. Belvindrah, S. Hankel, J. Walker, B. L. Patton, and U. Müller. Beta1 integrins control the formation of cell chains in the adult rostral migratory stream. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(10):2704–2717, Mar. 2007. 37

R. Belvindrah, A. Nissant, and P.-M. Lledo. Abnormal neuronal migration changes the fate of developing neurons in the postnatal olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(20):7551–7562, May 2011. 37, 38

P. Berbel and G. M. Innocenti. The development of the corpus callosum in cats: A light- and electron- microscopic study. *The Journal of Comparative Neurology*, 276(1):132–156, Oct. 1988. 17

B. M. Berg, J. P. Godbout, K. W. Kelley, and R. W. Johnson. Alpha-tocopherol attenuates lipopolysaccharide-induced sickness behavior in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 18 (2):149–157, Mar. 2004. 12

S. A. v. d. Berge, M. E. v. Strien, J. A. Korecka, A. A. Dijkstra, J. A. Sluijs, L. Kooijman, R. Eggers, L. D. Filippis, A. L. Vescovi, J. Verhaagen, W. D. J. v. d. Berg, and E. M. Hol. The proliferative capacity of the subventricular zone is maintained in the parkinsonian brain. *Brain*, 134(11):3249–3263, Nov. 2011. 48

U. Bergman, A. Ostergren, A.-L. Gustafson, and B. Brittebo. Differential effects of olfactory toxicants on olfactory regeneration. *Archives of Toxicology*, 76(2):104–112, Mar. 2002. 50

O. Bergmann, J. Liebl, S. Bernard, K. Alkass, M. S. Y. Yeung, P. Steier, W. Kutschera, L. Johnson, M. Landén, H. Druid, K. L. Spalding, and J. Frisén. The Age of Olfactory Bulb Neurons in Humans. *Neuron*, 74(4):634–639, May 2012. 49, 117

O. Bergmann, K. L. Spalding, and J. Frisén. Adult Neurogenesis in Humans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(7), 2015. 49

A. Bessis, C. Béchade, D. Bernard, and A. Roumier. Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia*, 55(3):233–238, Feb. 2007. 11, 16

L. K. Beura, S. E. Hamilton, K. Bi, J. M. Schenkel, O. A. Odumade, K. A. Casey, E. A. Thompson, K. A. Fraser, P. C. Rosato, A. Filali-Mouhim, R. P. Sekaly, M. K. Jenkins, V. Vezys, W. N. Haining, S. C. Jameson, and D. Masopust. Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature*, 532(7600):512–516, Apr. 2016. 116

A. Bhattacharya, N. C. Derecki, T. W. Lovenberg, and W. C. Drevets. Role of neuro-immunological factors in the pathophysiology of mood disorders. *Psychopharmacology*, 233(9):1623–1636, May 2016. 46

A. R. Bialas and B. Stevens. TGF-beta signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement. *Nature Neuroscience*, 16(12):1773–1782, Dec. 2013. 21

R. M. Bluthé, S. Layé, B. Michaud, C. Combe, R. Dantzer, and P. Parnet. Role of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a study with interleukin-1 type I receptor-deficient mice. *The European Journal of Neuroscience*, 12(12):4447–4456, Dec. 2000. 12

D. Boche, V. H. Perry, and J. a. R. Nicoll. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 39(1):3–18, Feb. 2013. 8

M. Bohatschek, C. U. Kloss, R. Kalla, and G. Raivich. In vitro model of microglial deramification: ramified microglia transform into amoeboid phagocytes following addition of brain cell membranes to microglia-astrocyte cocultures. *Journal of Neuroscience Research*, 64 (5):508–522, June 2001. 9

M. Boldrini, R. Hen, M. D. Underwood, G. B. Rosoklija, A. J. Dwork, J. J. Mann, and V. Arango. Hippocampal angiogenesis and progenitor cell proliferation are increased with antidepressant use in major depression. *Biological Psychiatry*, 72(7):562–571, Oct. 2012. 46

A. B. W. Boldt, I. Goeldner, and I. J. T. de Messias-Reason. Relevance of the lectin pathway of complement in rheumatic diseases. *Advances in Clinical Chemistry*, 56:105–153, 2012. 100

S. Bonde, C. T. Ekdahl, and O. Lindvall. Long-term neuronal replacement in adult rat hippocampus after status epilepticus despite chronic inflammation. *The European Journal of Neuroscience*, 23(4):965–974, Feb. 2006. 45

L. Bonfanti and D. T. Theodosis. Expression of polysialylated neural cell adhesion molecule by proliferating cells in the subependymal layer of the adult rat, in its rostral extension and in the olfactory bulb. *Neuroscience*, 62(1):291–305, Sept. 1994. 37

S. Bonzano, S. Bovetti, A. Fasolo, P. Peretto, and S. De Marchis. Odour enrichment increases adult-born dopaminergic neurons in the mouse olfactory bulb. *The European Journal of Neuroscience*, 40(10):3450–3457, Nov. 2014. 42

S. Bovetti, S. Bonzano, D. Garzotto, S. G. Giannelli, A. Iannielli, M. Armentano, M. Studer, and S. De Marchis. COUP-TFI controls activity-dependent tyrosine hydroxylase expression in adult dopaminergic olfactory bulb interneurons. *Development (Cambridge, England)*, 140(24):4850–4859, Dec. 2013. 42

H. Braak, K. D. Tredici, U. Rüb, R. A. I. de Vos, E. N. H. Jansen Steur, and E. Braak. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 24(2):197–211, Mar. 2003. 47, 48

I. Brandt, E. B. Brittebo, V. J. Feil, and J. E. Bakke. Irreversible binding and toxicity of the herbicide dichlobenil (2,6-dichlorobenzonitrile) in the olfactory mucosa of mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 103(3):491–501, May 1990. 50

J. H. Brann and S. J. Firestein. A lifetime of neurogenesis in the olfactory system. *Frontiers in Neuroscience*, 8:182, 2014. 23

V. Breton-Provencher, D. Coté, and A. Saghatelyan. Activity of the principal cells of the olfactory bulb promotes a structural dynamic on the distal dendrites of immature adult-born granule cells via activation of NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(5):1748–1759, Jan. 2014. 42, 60, 103

L. Buck and R. Axel. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1):175–187, Apr. 1991. 22

O. Butovsky, S. Siddiqui, G. Gabriely, A. J. Lanser, B. Dake, G. Murugaiyan, C. E. Doykan, P. M. Wu, R. R. Gali, L. K. Iyer, R. Lawson, J. Berry, A. M. Krichevsky, M. E. Cudkowicz, and H. L. Weiner. Modulating inflammatory monocytes with a unique microRNA gene signature ameliorates murine ALS. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(9):3063–3087, Sept. 2012. 6

A. Bédard, M. Cossette, M. Lévesque, and A. Parent. Proliferating cells can differentiate into neurons in the striatum of normal adult monkey. *Neuroscience Letters*, 328(3):213–216, Aug. 2002. 50

E. Cacci, M. A. Ajmone-Cat, T. Anelli, S. Biagioni, and L. Minghetti. In vitro neuronal and glial differentiation from embryonic or adult neural precursor cells are differently affected by chronic or acute activation of microglia. *Glia*, 56(4):412–425, Mar. 2008. 44

H. A. Cameron and R. D. McKay. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*, 435(4):406–417, July 2001. 33

V. Capilla-Gonzalez, E. Lavell, A. Quiñones-Hinojosa, and H. Guerrero-Cazares. Regulation of Subventricular Zone-Derived Cells Migration in the Adult Brain. In M. Ehtesham, editor, *Stem Cell Biology in Neoplasms of the Central Nervous System*, volume 853, pages 1–21. Springer International Publishing, Cham, 2015. 37, 38

G. A. Carlesimo, F. Piras, F. Assogna, F. E. Pontieri, C. Caltagirone, and G. Spalletta. Hippocampal abnormalities and memory deficits in Parkinson disease A multimodal imaging study. *Neurology*, 78(24):1939–1945, June 2012. 47

M. J. Carson, J. M. Doose, B. Melchior, C. D. Schmid, and C. C. Ploix. CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunological Reviews*, 213:48–65, Oct. 2006. 9, 61

P. E. Castillo, A. Carleton, J. D. Vincent, and P. M. Lledo. Multiple and opposing roles of cholinergic transmission in the main olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(21):9180–9191, Nov. 1999. 29

A. Cattaneo, M. Gennarelli, R. Uher, G. Breen, A. Farmer, K. J. Aitchison, I. W. Craig, C. Anacker, P. A. Zunsztain, P. McGuffin, and C. M. Pariante. Candidate genes expression profile associated with antidepressants response in the GENDEP study: differentiating between baseline 'predictors' and longitudinal 'targets'. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38(3):377–385, Feb. 2013. 47

J. W. Cave, M. Wang, and H. Baker. Adult subventricular zone neural stem cells as a potential source of dopaminergic replacement neurons. *Frontiers in Neuroscience*, 8:16, 2014. 48

B. Chamak, V. Morandi, and M. Mallat. Brain macrophages stimulate neurite growth and regeneration by secreting thrombospondin. *Journal of Neuroscience Research*, 38(2):221–233, June 1994. 14

A. Chan, V. Hummel, F. X. Weilbach, B. C. Kieseier, and R. Gold. Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells downregulates microglial chemoattractive function and migration of encephalitogenic T cells. *Journal of Neuroscience Research*, 84(6):1217–1224, Nov. 2006. 11

G. Chazal, P. Durbec, A. Jankovski, G. Rougon, and H. Cremer. Consequences of neural cell adhesion molecule deficiency on cell migration in the rostral migratory stream of the mouse. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(4):1446–1457, Feb. 2000. 37

D. Checchin, F. Sennlaub, E. Levavasseur, M. Leduc, and S. Chemtob. Potential Role of Microglia in Retinal Blood Vessel Formation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47(8):3595–3602, Aug. 2006. 16

C. Chen and W. G. Regehr. Developmental remodeling of the retinogeniculate synapse. *Neuron*, 28(3):955–966, Dec. 2000. 21

G. Y. Chen and G. Nuñez. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews. Immunology*, 10(12):826–837, Dec. 2010. 8

H. Chen, E. Jacobs, M. A. Schwarzschild, M. L. McCullough, E. E. Calle, M. J. Thun, and A. Ascherio. Nonsteroidal antiinflammatory drug use and the risk for Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 58(6):963–967, Dec. 2005. 13

Z. Chen, W. Jalabi, K. B. Shpargel, K. T. Farabaugh, R. Dutta, X. Yin, G. J. Kidd, C. C. Bergmann, S. A. Stohlman, and B. D. Trapp. Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(34):11706–11715, Aug. 2012. 12

M.-F. Cheng. Hypothalamic neurogenesis in the adult brain. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 34(3):167–178, Aug. 2013. 32

J. D. Cherry, J. A. Olschowka, and M. K. O'Banion. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of Neuroinflammation*, 11:98, 2014. 9

V. Chesnokova, R. N. Pechnick, and K. Wawrowsky. Chronic Peripheral Inflammation, Hippocampal Neurogenesis, and Behavior. *Brain, Behavior, and Immunity*, Jan. 2016. 59

I. M. Chiu, E. T. Morimoto, H. Goodarzi, J. T. Liao, S. O'Keeffe, H. P. Phatnani, M. Muratet, M. C. Carroll, S. Levy, S. Tavazoie, R. M. Myers, and T. Maniatis. A neurodegeneration-specific gene expression signature and immune profile of acutely isolated microglia from an ALS mouse model. *Cell reports*, 4(2):385–401, July 2013. 7

D. Chugh, P. Nilsson, S.-A. Afjei, A. Bakochi, and C. T. Ekdahl. Brain inflammation induces post-synaptic changes during early synapse formation in adult-born hippocampal neurons. *Experimental Neurology*, 250:176–188, Dec. 2013. 44

Y. C. Chung, S. R. Kim, J.-Y. Park, E. S. Chung, K. W. Park, S. Y. Won, E. Bok, M. Jin, E. S. Park, S.-H. Yoon, H. W. Ko, Y.-S. Kim, and B. K. Jin. Fluoxetine prevents MPTP-induced loss of dopaminergic neurons by inhibiting microglial activation. *Neuropharmacology*, 60 (6):963–974, May 2011. 111

D. Clemente, M. C. Ortega, C. Melero-Jerez, and F. de Castro. The effect of glia-glia interactions on oligodendrocyte precursor cell biology during development and in demyelinating diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7:268, 2013. 17

P. Codega, V. Silva-Vargas, A. Paul, A. R. Maldonado-Soto, A. M. Deleo, E. Pastrana, and F. Doetsch. Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron*, 82(3):545–559, May 2014. 33

C. A. Colton. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 4(4):399–418, Dec. 2009. 8

C. A. Colton and D. M. Wilcock. Assessing activation states in microglia. *CNS & neurological disorders drug targets*, 9(2):174–191, Apr. 2010. 8

A. W. Corona, D. M. Norden, J. P. Skendelas, Y. Huang, J. C. O'Connor, M. Lawson, R. Dantzer, K. W. Kelley, and J. P. Godbout. Indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition attenuates lipopolysaccharide induced persistent microglial activation and depressive-like complications in fractalkine receptor (CX(3)CR1)-deficient mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 31:134–142, July 2013. 13

Y. Couch, L. Alvarez-Erviti, N. R. Sibson, M. J. A. Wood, and D. C. Anthony. The acute inflammatory response to intranigral α-synuclein differs significantly from intranigral lipopolysaccharide and is exacerbated by peripheral inflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 8:166, 2011. 13

C. Cunningham. Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation. *Glia*, 61(1):71–90, Jan. 2013. 13, 14, 16

A. Currais. Ageing and inflammation - A central role for mitochondria in brain health and disease. *Ageing Research Reviews*, 21:30–42, May 2015. 99

M. Czeh, P. Gressens, and A. M. Kaindl. The yin and yang of microglia. *Developmental Neuroscience*, 33(3-4):199–209, 2011. 44

M. E. Dailey and M. Waite. Confocal imaging of microglial cell dynamics in hippocampal slice cultures. *Methods (San Diego, Calif.)*, 18(2):222–230, 177, June 1999. 9

R. Dantzer, J. C. O'Connor, G. G. Freund, R. W. Johnson, and K. W. Kelley. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(1):46–56, Jan. 2008. 12, 13

D. Davalos, J. Grutzendler, G. Yang, J. V. Kim, Y. Zuo, S. Jung, D. R. Littman, M. L. Dustin, and W.-B. Gan. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, 8(6):752–758, June 2005. 2, 10, 17

D. J. David, B. A. Samuels, Q. Rainer, J.-W. Wang, D. Marsteller, I. Mendez, M. Drew, D. A. Craig, B. P. Guiard, J.-P. Guilloux, R. P. Artymyshyn, A. M. Gardier, C. Gerald, I. A. Antonijevic, E. D. Leonardo, and R. Hen. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron*, 62(4):479–493, May 2009. 46, 80

L. S. David, M. Schachner, and A. Saghatelyan. The extracellular matrix glycoprotein tenascin-R affects adult but not developmental neurogenesis in the olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(25): 10324–10339, June 2013. 41

B. J. Davis and F. Macrides. The organization of centrifugal projections from the anterior olfactory nucleus, ventral hippocampal rudiment, and piriform cortex to the main olfactory bulb in the hamster: an autoradiographic study. *The Journal of Comparative Neurology*, 203(3):475–493, Dec. 1981. 30

B. J. Davis, F. Macrides, W. M. Youngs, S. P. Schneider, and D. L. Rosene. Efferents and centrifugal afferents of the main and accessory olfactory bulbs in the hamster. *Brain Research Bulletin*, 3(1):59–72, Feb. 1978. 29

A. G. Dayer, K. M. Cleaver, T. Abouantoun, and H. A. Cameron. New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *The Journal of Cell Biology*, 168(3):415–427, Jan. 2005. 50

J. A. De Carlos, L. López-Mascaraque, and F. Valverde. Connections of the olfactory bulb and nucleus olfactorius anterior in the hedgehog (Erinaceus europaeus): fluorescent tracers and HRP study. *The Journal of Comparative Neurology*, 279(4):601–618, Jan. 1989. 29

J. de Olmos, H. Hardy, and L. Heimer. The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formations in the rat: an experimental HRP-study. *The Journal of Comparative Neurology*, 181(2):213–244, Sept. 1978. 29

A. del Rey, D. Balschun, W. Wetzel, A. Randolf, and H. O. Besedovsky. A cytokine network involving brain-borne IL-1beta, IL-1ra, IL-18, IL-6, and TNFalpha operates during long-term potentiation and learning. *Brain, Behavior, and Immunity*, 33:15–23, Oct. 2013. 11

P. del Rio-Hortega. Un nuevo método de coloración histológica e histopatológica. *Boletin Sociedad Espagnola de Biologia*, VII:19–25, 1916. 2

P. del Rio-Hortega. El "tercer elemento" de los centros nerviosos. I. La microglía en estado normal. II. Intervención de la microglía en los procesos patológicos (células en bastoncito y cuerpos gránulo-adiposos). III. Naturaleza probable de la microglía. IV. Poder fagocitario y movilidad de la microglía. *Boletin Sociedad Espagnola de Biologia*, VIII:69–166, 1919. 1, 2

P. del Rio-Hortega. The microglia. *The Lancet*, 233:1023–1026, 1939. 2

P. del Rio-Hortega and W. Penfield. *Cytology & [and] Cellular Pathology of the Nervous System*. Hoeber, 1932. 1, 2, 3

K. Del Tredici and H. Braak. Review: Sporadic Parkinson's disease: development and distribution of α-synuclein pathology. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 42(1):33–50, Feb. 2016. 48

A. M. Depino, C. Earl, E. Kaczmarczyk, C. Ferrari, H. Besedovsky, A. del Rey, F. J. Pitossi, and W. H. Oertel. Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*, 18(10):2731–2742, Nov. 2003. WOS:000186799700007. 13

A. Deshpande, M. Bergami, A. Ghanem, K.-K. Conzelmann, A. Lepier, M. Götz, and B. Berninger. Retrograde monosynaptic tracing reveals the temporal evolution of inputs onto new neurons in the adult dentate gyrus and olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(12):E1152–1161, Mar. 2013. 43

D. DiSabato, N. Quan, and J. P. Godbout. Neuroinflammation: The Devil is in the Details. *Journal of Neurochemistry*, Mar. 2016. 12, 14

L. Dissing-Olesen, J. M. LeDue, R. L. Rungta, J. K. Hefendehl, H. B. Choi, and B. A. MacVicar. Activation of neuronal NMDA receptors triggers transient ATP-mediated microglial process outgrowth. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(32):10511–10527, Aug. 2014. 17

F. Doetsch, J. M. García-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(13):5046–5061, July 1997. 34, 35

F. Doetsch, I. Caillé, D. A. Lim, J. M. García-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla. Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. *Cell*, 97(6):703–716, June 1999. 34

B. A. Durafourt, C. S. Moore, D. A. Zammit, T. A. Johnson, F. Zaguia, M.-C. Guiot, A. Bar-Or, and J. P. Antel. Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages. *Glia*, 60(5):717–727, May 2012. 9

D. Eckmeier and S. D. Shea. Noradrenergic plasticity of olfactory sensory neuron inputs to the main olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(46):15234–15243, Nov. 2014. 28

V. Egger and N. N. Urban. Dynamic connectivity in the mitral cell-granule cell microcircuit. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 17(4):424–432, Aug. 2006. 23

M. A. Eglitis and E. Mezey. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(8):4080–4085, Apr. 1997. 5

A. J. Eisch and D. Petrik. Depression and hippocampal neurogenesis: a road to remission? *Science (New York, N.Y.)*, 338(6103):72–75, Oct. 2012. 46

C. T. Ekdahl. Microglial activation - tuning and pruning adult neurogenesis. *Frontiers in Pharmacology*, 3:41, 2012. 45

C. T. Ekdahl, J.-H. Claasen, S. Bonde, Z. Kokaia, and O. Lindvall. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23):13632–13637, Nov. 2003. 44, 45, 53

C. T. Ekdahl, Z. Kokaia, and O. Lindvall. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience*, 158(3):1021–1029, Feb. 2009. 45

A. Elvington, C. Atkinson, H. Zhu, J. Yu, K. Takahashi, G. L. Stahl, M. S. Kindy, and S. Tomlinson. The alternative complement pathway propagates inflammation and injury in murine ischemic stroke. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 189(9):4640–4647, Nov. 2012. 19

P. S. Eriksson, E. Perfilieva, T. Björk-Eriksson, A.-M. Alborn, C. Nordborg, D. A. Peterson, and F. H. Gage. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*, 4(11): 1313–1317, Nov. 1998. 49

A. Ernst and J. Frisén. Adult Neurogenesis in Humans- Common and Unique Traits in Mammals. *PLOS Biol*, 13(1):e1002045, Jan. 2015. 50

A. Ernst, K. Alkass, S. Bernard, M. Salehpour, S. Perl, J. Tisdale, G. Possnert, H. Druid, and J. Frisén. Neurogenesis in the Striatum of the Adult Human Brain. *Cell*, 156(5): 1072–1083, Feb. 2014. 50

M. L. Estes and A. K. McAllister. Alterations in Immune Cells and Mediators in the Brain: It's Not Always Neuroinflammation! *Brain Pathology*, 24(6):623–630, Nov. 2014. 12

J. Evans, C. Sumners, J. Moore, M. J. Huentelman, J. Deng, C. H. Gelband, and G. Shaw. Characterization of mitotic neurons derived from adult rat hypothalamus and brain stem. *Journal of Neurophysiology*, 87(2):1076–1085, Feb. 2002. 32

M. Fakhoury. Role of Immunity and Inflammation in the Pathophysiology of Neurodegenerative Diseases. *Neuro-Degenerative Diseases*, 15(2):63–69, 2015. 99

A. Fantin, J. M. Vieira, G. Gestri, L. Denti, Q. Schwarz, S. Prykhozhij, F. Peri, S. W. Wilson, and C. Ruhrberg. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood*, 116(5):829–840, Aug. 2010. 16

D. M. Feliciano, A. Bordey, and L. Bonfanti. Noncanonical Sites of Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(10):a018846, Oct. 2015. 32

I. Ferrer, T. Serrano, and E. Soriano. Naturally occurring cell death in the subicular complex and hippocampus in the rat during development. *Neuroscience Research*, 8(1):60–66, Apr. 1990. 11, 16

M. Florio and W. B. Huttner. Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development (Cambridge, England)*, 141(11):2182–2194, June 2014. 31

M. I. Fonseca, R. R. Ager, S.-H. Chu, O. Yazan, S. D. Sanderson, F. M. LaFerla, S. M. Taylor, T. M. Woodruff, and A. J. Tenner. Treatment with a C5ar antagonist decreases pathology and enhances behavioral performance in murine models of Alzheimer's disease. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183(2):1375–1383, July 2009. 19

M. I. Fonseca, S.-H. Chu, A. M. Berci, M. E. Benoit, D. G. Peters, Y. Kimura, and A. J. Tenner. Contribution of complement activation pathways to neuropathology differs among mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 8(1):4, 2011. 19

M. Fotuhi, D. Do, and C. Jack. Modifiable factors that alter the size of the hippocampus with ageing. *Nature Reviews. Neurology*, 8(4):189–202, Apr. 2012. 46

L. Fourgeaud, P. G. Través, Y. Tufail, H. Leal-Bailey, E. D. Lew, P. G. Burrola, P. Callaway, A. Zagórska, C. V. Rothlin, A. Nimmerjahn, and G. Lemke. TAM receptors regulate multiple features of microglial physiology. *Nature*, 532(7598):240–244, Apr. 2016. 18

J. M. Frade and Y. A. Barde. Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron*, 20(1):35–41, Jan. 1998. 16

M. G. Frank, M. V. Baratta, D. B. Sprunger, L. R. Watkins, and S. F. Maier. Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS pro-inflammatory cytokine responses. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(1):47–59, Jan. 2007. 13

M. G. Frank, S. A. Hershman, M. D. Weber, L. R. Watkins, and S. F. Maier. Chronic exposure to exogenous glucocorticoids primes microglia to pro-inflammatory stimuli and induces NLRP3 mRNA in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology*, 40:191–200, Feb. 2014. 8, 13, 46, 113

T. C. Frank-Cannon, T. Tran, K. A. Ruhn, T. N. Martinez, J. Hong, M. Marvin, M. Hartley, I. Treviño, D. E. O'Brien, B. Casey, M. S. Goldberg, and M. G. Tansey. Parkin deficiency increases vulnerability to inflammation-related nigral degeneration. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(43):10825–10834, Oct. 2008. 13

T. C. Frank-Cannon, L. T. Alto, F. E. McAlpine, and M. G. Tansey. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Molecular Neurodegeneration*, 4:47, 2009. 44

I. B. Fricke, T. Viel, M. M. Worlitzer, F. M. Collmann, A. Vrachimis, A. Faust, L. Wachsmuth, C. Faber, F. Dollé, M. T. Kuhlmann, K. Schäfers, S. Hermann, J. C. Schwamborn, and A. H. Jacobs. 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease-like degeneration generates acute microgliosis and astrogliosis in the nigrostriatal system but no bioluminescence imaging-detectable alteration in adult neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, pages n/a–n/a, Apr. 2016. 48

J. L. Frost and D. P. Schafer. Microglia: Architects of the Developing Nervous System. *Trends in Cell Biology*, Mar. 2016. 14, 59, 60

L. Fuentealba, S. Rompani, J. Parraguez, K. Obernier, R. Romero, C. Cepko, and A. Alvarez-Buylla. Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell*, 161(7):1644–1655, June 2015. 35

F. H. Gage. Mammalian neural stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5457):1433–1438, Feb. 2000. 34

H.-M. Gao, F. Zhang, H. Zhou, W. Kam, B. Wilson, and J.-S. Hong. Neuroinflammation and alpha-Synuclein Dysfunction Potentiate Each Other, Driving Chronic Progression of Neurodegeneration in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Environmental Health Perspectives*, 119(6):807–814, June 2011. WOS:000291152000024. 13

I. Garcia, K. B. Quast, L. Huang, A. M. Herman, J. Selever, J. M. Deussing, N. J. Justice, and B. R. Arenkiel. Local CRH signaling promotes synaptogenesis and circuit integration of adult-born neurons. *Developmental Cell*, 30(6):645–659, Sept. 2014. 43

L. M. Garcia-Segura. Cajal and glial cells. *Progress in Brain Research*, 136:255–260, 2002. 2

J. García-Marqués, J. A. De Carlos, C. A. Greer, and L. López-Mascaraque. Different astroglia permissivity controls the migration of olfactory bulb interneuron precursors. *Glia*, 58(2): 218–230, Jan. 2010. 37

V. García-Marín, P. García-López, and M. Freire. Cajal's contributions to glia research. *Trends in Neurosciences*, 30(9):479–487, Sept. 2007. 2

N. Garrido-Mesa, A. Zarzuelo, and J. Gálvez. Minocycline: far beyond an antibiotic. *British Journal of Pharmacology*, 169(2):337–352, May 2013. 53

E. L. Gautier, T. Shay, J. Miller, M. Greter, C. Jakubzick, S. Ivanov, J. Helft, A. Chow, K. G. Elpek, S. Gordonov, A. R. Mazloom, A. Ma'ayan, W.-J. Chua, T. H. Hansen, S. J. Turley, M. Merad, G. J. Randolph, and Immunological Genome Consortium. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nature Immunology*, 13(11):1118–1128, Nov. 2012. 7

E. Gebara, S. Sultan, J. Kocher-Braissant, and N. Toni. Adult hippocampal neurogenesis inversely correlates with microglia in conditions of voluntary running and aging. *Frontiers in Neuroscience*, 7:145, 2013. 18

A. Gengatharan, R. R. Bammann, and A. Saghatelyan. The Role of Astrocytes in the Generation, Migration, and Integration of New Neurons in the Adult Olfactory Bulb. *Frontiers in Neuroscience*, 10, Apr. 2016. 35

F. Ginhoux and M. Prinz. Origin of Microglia: Current Concepts and Past Controversies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, page a020537, July 2015. 4

F. Ginhoux, M. Greter, M. Leboeuf, S. Nandi, P. See, S. Gokhan, M. F. Mehler, S. J. Conway, L. G. Ng, E. R. Stanley, I. M. Samokhvalov, and M. Merad. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science (New York, N.Y.)*, 330 (6005):841–845, Nov. 2010. 2, 4, 5, 14

F. Ginhoux, S. Lim, G. Hoeffel, D. Low, and T. Huber. Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7:45, 2013. 14

C. K. Glass, K. Saijo, B. Winner, M. C. Marchetto, and F. H. Gage. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140(6):918–934, Mar. 2010. 45

S. Gluska, E. E. Zahavi, M. Chein, T. Gradus, A. Bauer, S. Finke, and E. Perlson. Rabies Virus Hijacks and Accelerates the p75ntr Retrograde Axonal Transport Machinery. *PLOS Pathog*, 10(8):e1004348, Aug. 2014. 12

S. A. Goldman and F. Nottebohm. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(8):2390–2394, Apr. 1983. 30

T. Goldmann, P. Wieghofer, P. F. Müller, Y. Wolf, D. Varol, S. Yona, S. M. Brendecke, K. Kierdorf, O. Staszewski, M. Datta, T. Luedde, M. Heikenwalder, S. Jung, and M. Prinz. A new type of microglia gene targeting shows TAK1 to be pivotal in CNS autoimmune inflammation. *Nature Neuroscience*, 16(11):1618–1626, Nov. 2013. 4

D. Gomez-Nicola and V. H. Perry. Microglial Dynamics and Role in the Healthy and Diseased Brain: A Paradigm of Functional Plasticity. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, Apr. 2014. 11

I. Goshen and R. Yirmiya. Interleukin-1 (IL-1): a central regulator of stress responses. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30(1):30–45, Jan. 2009. 11

I. Goshen, A. Avital, T. Kreisel, T. Licht, M. Segal, and R. Yirmiya. Environmental enrichment restores memory functioning in mice with impaired IL-1 signaling via reinstatement of long-term potentiation and spine size enlargement. *The Journal of Neuroscience*, 29 (11):3395–3403, 2009. 45

E. Gould and H. A. Cameron. Regulation of neuronal birth, migration and death in the rat dentate gyrus. *Developmental Neuroscience*, 18(1-2):22–35, 1996. 46

K. Grabert, T. Michoel, M. H. Karavolos, S. Clohisey, J. K. Baillie, M. P. Stevens, T. C. Freeman, K. M. Summers, and B. W. McColl. Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nature Neuroscience*, 19(3):504–516, Mar. 2016. 7, 61

F. J. Gracia-Llanes, C. Crespo, J. M. Blasco-Ibáñez, J. Nacher, E. Varea, L. Rovira-Esteban, and F. J. Martínez-Guijarro. GABAergic basal forebrain afferents innervate selectively GABAergic targets in the main olfactory bulb. *Neuroscience*, 170(3):913–922, Oct. 2010. 29

E. R. Griff, M. Mafhouz, and M. A. Chaput. Comparison of identified mitral and tufted cells in freely breathing rats: II. Odor-evoked responses. *Chemical Senses*, 33(9):793–802, Nov. 2008. 26

A. Gritti, L. Bonfanti, F. Doetsch, I. Caille, A. Alvarez-Buylla, D. A. Lim, R. Galli, J. M. G. Verdugo, D. G. Herrera, and A. L. Vescovi. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(2):437–445, Jan. 2002. 37

M. Guilliams, I. De Kleer, S. Henri, S. Post, L. Vanhoutte, S. De Prijck, K. Deswarte, B. Malissen, H. Hammad, and B. N. Lambrecht. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(10):1977–1992, Sept. 2013. 4

L. B. Haberly. Parallel-distributed processing in olfactory cortex: new insights from morphological and physiological analysis of neuronal circuitry. *Chemical senses*, 26(5):551–576, 2001. 27

L. B. Haberly and J. L. Price. The axonal projection patterns of the mitral and tufted cells of the olfactory bulb in the rat. *Brain Research*, 129(1):152–157, June 1977. 26

I. Hack, M. Bancila, K. Loulier, P. Carroll, and H. Cremer. Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nature Neuroscience*, 5(10): 939–945, Oct. 2002. 38

U.-K. Hanisch and H. Kettenmann. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience*, 10(11):1387–1394, Nov. 2007. 8, 11

J. Hannestad, N. DellaGioia, and M. Bloch. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 36(12):2452–2459, Nov. 2011. 47

N. D. Hanson, M. J. Owens, and C. B. Nemeroff. Depression, antidepressants, and neurogenesis: a critical reappraisal. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 36(13):2589–2602, Dec. 2011. 46

K. M. Harris, F. E. Jensen, and B. Tsao. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 12(7):2685–2705, July 1992. 104

B. Hattiangady and A. K. Shetty. Decreased neuronal differentiation of newly generated cells underlies reduced hippocampal neurogenesis in chronic temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*, 20(1):97–112, Jan. 2010. 45

A. Hayar, P. M. Heyward, T. Heinbockel, M. T. Shipley, and M. Ennis. Direct excitation of mitral cells via activation of alpha1-noradrenergic receptors in rat olfactory bulb slices. *Journal of Neurophysiology*, 86(5):2173–2182, Nov. 2001. 28

J. K. Hefendehl, J. J. Neher, R. B. Sühs, S. Kohsaka, A. Skodras, and M. Jucker. Homeostatic and injury-induced microglia behavior in the aging brain. *Aging Cell*, 13(1):60–69, 2014. 11

L. Heimer. Synaptic distribution of centripetal and centrifugal nerve fibres in the olfactory system of the rat. An experimental anatomical study. *Journal of Anatomy*, 103(Pt 3): 413–432, Nov. 1968. 26

J. S. Henkel, D. R. Beers, W. Zhao, and S. H. Appel. Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 4(4):389–398, Dec. 2009. 8

C. J. Henry, Y. Huang, A. M. Wynne, and J. P. Godbout. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(3):309–317, Mar. 2009. 12

R. P. Herbert, J. Harris, K. P. Chong, J. Chapman, A. K. West, and M. I. Chuah. Cytokines and olfactory bulb microglia in response to bacterial challenge in the compromised primary olfactory pathway. *Journal of Neuroinflammation*, 9:109, 2012. 52

P. Herbomel, B. Thisse, and C. Thisse. Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process. *Developmental Biology*, 238(2):274–288, Oct. 2001. 4

W. F. Hickey and H. Kimura. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, 239(4837):290–292, Jan. 1988. 5

S. E. Hickman, N. D. Kingery, T. K. Ohsumi, M. L. Borowsky, L.-c. Wang, T. K. Means, and J. El Khoury. The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nature Neuroscience*, 16(12):1896–1905, Dec. 2013. 7

C. Hinnell, C. S. Hurt, S. Landau, R. G. Brown, M. Samuel, and on behalf of the PROMS-PD Study Group. Nonmotor versus motor symptoms: How much do they matter to health status in Parkinson's disease? *Movement Disorders*, 27(2):236–241, Feb. 2012. 47

G. Hoeffel, Y. Wang, M. Greter, P. See, P. Teo, B. Malleret, M. Leboeuf, D. Low, G. Oller, F. Almeida, S. H. Y. Choy, M. Grisotto, L. Renia, S. J. Conway, E. R. Stanley, J. K. Y. Chan, L. G. Ng, I. M. Samokhvalov, M. Merad, and F. Ginhoux. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(6):1167–1181, June 2012. 4

Y. K. Hong and C. Chen. Wiring and rewiring of the retinogeniculate synapse. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(2):228–237, Apr. 2011. 21

L. E. Hopkins, E. S. Patchin, P.-L. Chiu, C. Brandenberger, S. Smiley-Jewell, and K. E. Pinkerton. Nose-to-brain transport of aerosolised quantum dots following acute exposure. *Nanotoxicology*, 8(8):885–893, Dec. 2014. 52

C. H. H. Hor and B. L. Tang. Sonic hedgehog as a chemoattractant for adult NPCs. *Cell Adhesion & Migration*, 4(1):1–3, Mar. 2010. 37

M. Hoshiko, I. Arnoux, E. Avignone, N. Yamamoto, and E. Audinat. Deficiency of the microglial receptor CX3cr1 impairs postnatal functional development of thalamocortical synapses in the barrel cortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(43):15106–15111, Oct. 2012. 17

C. Hoyo-Becerra, J. F. Schlaak, and D. M. Hermann. Insights from interferon-α-related depression for the pathogenesis of depression associated with inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 42:222–231, Nov. 2014. 47

H. Hu, H. Tomasiewicz, T. Magnuson, and U. Rutishauser. The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron*, 16 (4):735–743, Apr. 1996. 37

J. Y. Hua and S. J. Smith. Neural activity and the dynamics of central nervous system development. *Nature Neuroscience*, 7(4):327–332, Apr. 2004. 17

G. U. Höglinger, P. Rizk, M. P. Muriel, C. Duyckaerts, W. H. Oertel, I. Caille, and E. C. Hirsch. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nature Neuroscience*, 7(7):726–735, July 2004. 48

T. Ichikawa and Y. Hirata. Organization of choline acetyltransferase-containing structures in the forebrain of the rat. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 6(1):281–292, Jan. 1986. 28

K. R. Illig and L. B. Haberly. Odor-evoked activity is spatially distributed in piriform cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 457(4):361–373, 2003. 27

F. Imamura, H. Nagao, H. Naritsuka, Y. Murata, H. Taniguchi, and K. Mori. A leucine-rich repeat membrane protein, 5t4, is expressed by a subtype of granule cells with dendritic arbors in specific strata of the mouse olfactory bulb. *The Journal of Comparative Neurology*, 495(6):754–768, Apr. 2006. 41

I. Imayoshi, M. Sakamoto, T. Ohtsuka, K. Takao, T. Miyakawa, M. Yamaguchi, K. Mori, T. Ikeda, S. Itohara, and R. Kageyama. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature Neuroscience*, 11(10):1153–1161, Oct. 2008. 41

T. Imura, H. I. Kornblum, and M. V. Sofroniew. The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(7): 2824–2832, Apr. 2003. 34

D. Inta, J. Alfonso, J. v. Engelhardt, M. M. Kreuzberg, A. H. Meyer, J. A. v. Hooft, and H. Monyer. Neurogenesis and widespread forebrain migration of distinct GABAergic neurons from the postnatal subventricular zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52):20994–20999, Dec. 2008. 50

R. E. Iosif, C. T. Ekdahl, H. Ahlenius, C. J. H. Pronk, S. Bonde, Z. Kokaia, S.-E. W. Jacobsen, and O. Lindvall. Tumor necrosis factor receptor 1 is a negative regulator of progenitor proliferation in adult hippocampal neurogenesis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(38):9703–9712, Sept. 2006. 44

J. S. Isaacson and B. W. Strowbridge. Olfactory reciprocal synapses: dendritic signaling in the CNS. *Neuron*, 20(4):749–761, Apr. 1998. 23

C. E. Jahr and R. A. Nicoll. Noradrenergic modulation of dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb. *Nature*, 297(5863):227–229, May 1982. 28

A. Jankovski and C. Sotelo. Subventricular zone-olfactory bulb migratory pathway in the adult mouse: cellular composition and specificity as determined by heterochronic and heterotopic transplantation. *The Journal of Comparative Neurology*, 371(3):376–396, July 1996. 37

L. Jaubert-Miazza, E. Green, F.-S. Lo, K. Bui, J. Mills, and W. Guido. Structural and functional composition of the developing retinogeniculate pathway in the mouse. *Visual Neuroscience*, 22(5):661–676, Oct. 2005. 21

M. Jiang, E. R. Griff, M. Ennis, L. A. Zimmer, and M. T. Shipley. Activation of locus coeruleus enhances the responses of olfactory bulb mitral cells to weak olfactory nerve input. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(19):6319–6329, Oct. 1996. 28

N. Kaneko, O. Marín, M. Koike, Y. Hirota, Y. Uchiyama, J. Y. Wu, Q. Lu, M. Tessier-Lavigne, A. Alvarez-Buylla, H. Okano, J. L. R. Rubenstein, and K. Sawamoto. New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. *Neuron*, 67 (2):213–223, July 2010. 37

N. Kang and J. Koo. Olfactory receptors in non-chemosensory tissues. *BMB Reports*, 45(11): 612–622, Nov. 2012. 22

C. Kappeler, Y. Saillour, J.-P. Baudoin, F. P. D. Tuy, C. Alvarez, C. Houbron, P. Gaspar, G. Hamard, J. Chelly, C. Métin, and F. Francis. Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived from doublecortin knockout mice. *Human Molecular Genetics*, 15(9):1387–1400, May 2006. 37

A. Karperien, H. Ahammer, and H. Jelinek. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7:3, 2013. 10

P. Kasa, I. Hlavati, E. Dobo, A. Wolff, F. Joo, and J. R. Wolff. Synaptic and non-synaptic cholinergic innervation of the various types of neurons in the main olfactory bulb of adult rat: immunocytochemistry of choline acetyltransferase. *Neuroscience*, 67(3):667–677, Aug. 1995. 28

L. C. Katz and C. J. Shatz. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5290):1133–1138, Nov. 1996. 17, 21

L. M. Kay and G. Laurent. Odor- and context-dependent modulation of mitral cell activity in behaving rats. *Nature Neuroscience*, 2(11):1003–1009, Nov. 1999. 30

W. Kelsch, C.-W. Lin, and C. Lois. Sequential development of synapses in dendritic domains during adult neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(43):16803–16808, Oct. 2008. 39, 42

W. Kelsch, C.-W. Lin, C. P. Mosley, and C. Lois. A critical period for activity-dependent synaptic development during olfactory bulb adult neurogenesis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(38):11852–11858, Sept. 2009. 42

W. Kelsch, Z. Li, M. Eliava, C. Goengrich, and H. Monyer. GluN2b-containing NMDA receptors promote wiring of adult-born neurons into olfactory bulb circuits. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(36):12603–12611, Sept. 2012a. 42

W. Kelsch, S. Sim, and C. Lois. Increasing heterogeneity in the organization of synaptic inputs of mature olfactory bulb neurons generated in newborn rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 520(6):1327–1338, Apr. 2012b. 42, 43

C. Kelsom and W. Lu. Development and specification of GABAergic cortical interneurons. *Cell & Bioscience*, 3:19, Apr. 2013. 31

G. Kempermann, H. G. Kuhn, and F. H. Gage. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386(6624):493–495, 1997. 45

K. Khodosevich, F. Lazarini, J. von Engelhardt, H. Kaneko, P.-M. Lledo, and H. Monyer. Connective tissue growth factor regulates interneuron survival and information processing in the olfactory bulb. *Neuron*, 79(6):1136–1151, Sept. 2013. 55

K. Kierdorf, D. Erny, T. Goldmann, V. Sander, C. Schulz, E. G. Perdiguero, P. Wieghofer, A. Heinrich, P. Riemke, C. Hölscher, D. N. Müller, B. Luckow, T. Brocker, K. Debowski, G. Fritz, G. Opdenakker, A. Diefenbach, K. Biber, M. Heikenwalder, F. Geissmann, F. Rosenbauer, and M. Prinz. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nature Neuroscience*, 16(3):273–280, Mar. 2013. 4

S. Kikuta, K. Sato, H. Kashiwadani, K. Tsunoda, T. Yamasoba, and K. Mori. Neurons in the anterior olfactory nucleus pars externa detect right or left localization of odor sources. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(27): 12363–12368, July 2010. 26

I. L. King, T. L. Dickendesher, and B. M. Segal. Circulating Ly-6c+ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood*, 113(14):3190–3197, Apr. 2009. 6

E. Kiyokage, Y.-Z. Pan, Z. Shao, K. Kobayashi, G. Szabo, Y. Yanagawa, K. Obata, H. Okano, K. Toida, A. C. Puche, and M. T. Shipley. Molecular identity of periglomerular and short axon cells. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(3):1185–1196, Jan. 2010. 24, 25, 26

P. Kohli, Z. M. Soler, S. A. Nguyen, J. S. Muus, and R. J. Schlosser. The Association Between Olfaction and Depression: A Systematic Review. *Chemical Senses*, May 2016. 47, 80, 117

M. Kohwi, N. Osumi, J. L. R. Rubenstein, and A. Alvarez-Buylla. Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(30): 6997–7003, July 2005. 41

H. Koizumi, H. Higginbotham, T. Poon, T. Tanaka, B. C. Brinkman, and J. G. Gleeson. Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain. *Nature Neuroscience*, 9(6):779–786, June 2006. 37

S. Komano-Inoue, H. Manabe, M. Ota, I. Kusumoto-Yoshida, T. K. Yokoyama, K. Mori, and M. Yamaguchi. Top-down inputs from the olfactory cortex in the postprandial period promote elimination of granule cells in the olfactory bulb. *The European Journal of Neuroscience*, 40(5):2724–2733, Sept. 2014. 43

K. Kosaka and T. Kosaka. Synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: Compartments of the glomerulus and heterogeneity of the periglomerular cells. *Anatomical Science International*, 80(2):80–90, June 2005. 24

K. Kosaka, K. Toida, F. L. Margolis, and T. Kosaka. Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb: prominent differences in the intraglomerular dendritic arborization and their relationship to olfactory nerve terminals. *Neuroscience*, 76(3):775–786, Dec. 1996. 26

L. Kouser, S. P. Madhukaran, A. Shastri, A. Saraon, J. Ferluga, M. Al-Mozaini, and U. Kishore. Emerging and Novel Functions of Complement Protein C1q. *Frontiers in Immunology*, 6:317, 2015. 21

G. Krabbe, V. Matyash, U. Pannasch, L. Mamer, H. W. G. M. Boddeke, and H. Kettenmann. Activation of serotonin receptors promotes microglial injury-induced motility but attenuates phagocytic activity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(3):419–428, Mar. 2012. 111

A. Kriegstein and A. Alvarez-Buylla. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience*, 32:149–184, 2009. 14

Y. Kubota, K. Takubo, T. Shimizu, H. Ohno, K. Kishi, M. Shibuya, H. Saya, and T. Suda. M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(5):1089–1102, May 2009. 16

M. Laska and P. Teubner. Olfactory discrimination ability of human subjects for ten pairs of enantiomers. *Chemical Senses*, 24(2):161–170, Apr. 1999. 22

C. G. Lau and V. N. Murthy. Activity-dependent regulation of inhibition via GAD67. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(25): 8521–8531, June 2012. 43

L. J. Lawson, V. H. Perry, P. Dri, and S. Gordon. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 39(1):151–170, 1990. 9, 61

E. D. Laywell, P. Rakic, V. G. Kukekov, E. C. Holland, and D. A. Steindler. Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25):13883–13888, Dec. 2000. 34

F. Lazarini, M.-A. Mouthon, G. Gheusi, F. de Chaumont, J.-C. Olivo-Marin, S. Lamarque, D. N. Abrous, F. D. Boussin, and P.-M. Lledo. Cellular and behavioral effects of cranial irradiation of the subventricular zone in adult mice. *PloS One*, 4(9):e7017, 2009. 60

F. Lazarini, M.-M. Gabellec, N. Torquet, and P.-M. Lledo. Early activation of microglia triggers long-lasting impairment of adult neurogenesis in the olfactory bulb. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(11):3652–3664, Mar. 2012. 51, 59

F. Lazarini, M.-M. Gabellec, C. Moigneu, F. de Chaumont, J.-C. Olivo-Marin, and P.-M. Lledo. Adult neurogenesis restores dopaminergic neuronal loss in the olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(43): 14430–14442, Oct. 2014. 39, 42, 48, 57, 60, 115, 117

D. A. Lee, J. L. Bedont, T. Pak, H. Wang, J. Song, A. Miranda-Angulo, V. Takiar, V. Charubhumi, F. Balordi, H. Takebayashi, S. Aja, E. Ford, G. Fishell, and S. Blackshaw. Tanycytes of the Hypothalamic Median Eminence Form a Diet-Responsive Neurogenic Niche. *Nature neuroscience*, 15(5):700–702, Mar. 2012. 32

J. W. Lee, Y. K. Lee, D. Y. Yuk, D. Y. Choi, S. B. Ban, K. W. Oh, and J. T. Hong. Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. *Journal of Neuroinflammation*, 5:37, 2008. 13

M. L. Lehmann, R. A. Brachman, K. Martinowich, R. J. Schloesser, and M. Herkenham. Glucocorticoids Orchestrate Divergent Effects on Mood through Adult Neurogenesis. *The Journal of Neuroscience*, 33(7):2961–2972, Feb. 2013. 46

M. Lemasson, A. Saghatelyan, J.-C. Olivo-Marin, and P.-M. Lledo. Neonatal and Adult Neurogenesis Provide Two Distinct Populations of Newborn Neurons to the Mouse Olfactory Bulb. *The Journal of Neuroscience*, 25(29):6816–6825, July 2005. 41

B. E. Leonard. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy*, 36(5):561–569, Oct. 1984. 47

F. L'Episcopo, C. Tirolo, N. Testa, S. Caniglia, M. C. Morale, F. Impagnatiello, and B. Marchetti. Switching the Microglial Harmful Phenotype Promotes Lifelong Restoration of Subtantia Nigra Dopaminergic Neurons from Inflammatory Neurodegeneration in Aged Mice. *Rejuvenation Research*, 14(4):411–424, Aug. 2011. WOS:000294057000008. 13

G. Lepousez and P.-M. Lledo. Odor discrimination requires proper olfactory fast oscillations in awake mice. *Neuron*, 80(4):1010–1024, Nov. 2013. 24

G. Lepousez, A. Nissant, A. K. Bryant, G. Gheusi, C. A. Greer, and P.-M. Lledo. Olfactory learning promotes input-specific synaptic plasticity in adult-born neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(38):13984–13989, Sept. 2014. 29, 43, 44, 60

M. H. Lewis. Environmental complexity and central nervous system development and function. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 10(2):91–95, 2004. 116

Q. Li and S. D. Liberles. Aversion and attraction through olfaction. *Current biology : CB*, 25(3):R120–R129, Feb. 2015. 22

Y. Li, X.-F. Du, C.-S. Liu, Z.-L. Wen, and J.-L. Du. Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Developmental Cell*, 23(6):1189–1202, Dec. 2012. 11, 17

Y. Li, X.-f. Du, and J.-l. Du. Resting microglia respond to and regulate neuronal activity in vivo. *Communicative & Integrative Biology*, 6(4):e24493, July 2013. 11

D. A. Lim and A. Alvarez-Buylla. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(13):7526–7531, June 1999. 34

D. A. Lim and A. Alvarez-Buylla. Adult neural stem cells stake their ground. *Trends in Neurosciences*, 37(10):563–571, Oct. 2014. 35, 36, 111

D. A. Lim, A. D. Tramontin, J. M. Trevejo, D. G. Herrera, J. M. García-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla. Noggin Antagonizes BMP Signaling to Create a Niche for Adult Neurogenesis. *Neuron*, 28(3):713–726, Dec. 2000. 34

B. Linnartz, J. Kopatz, A. J. Tenner, and H. Neumann. Sialic acid on the neuronal glycocalyx prevents complement C1 binding and complement receptor-3-mediated removal by microglia. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(3):946–952, Jan. 2012. 21

B. Linnartz-Gerlach, M. Mathews, and H. Neumann. Sensing the neuronal glycocalyx by glial sialic acid binding immunoglobulin-like lectins. *Neuroscience*, 275C:113–124, June 2014. 21

Y. Livneh and A. Mizrahi. Long-term changes in the morphology and synaptic distributions of adult-born neurons. *The Journal of comparative neurology*, 519(11):2212–2224, Aug. 2011. 39

Y. Livneh and A. Mizrahi. Experience-dependent plasticity of mature adult-born neurons. *Nature Neuroscience*, 15(1):26–28, Jan. 2012. 42

Y. Livneh, N. Feinstein, M. Klein, and A. Mizrahi. Sensory input enhances synaptogenesis of adult-born neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(1):86–97, Jan. 2009. 42

Y. Livneh, Y. Adam, and A. Mizrahi. Odor processing by adult-born neurons. *Neuron*, 81 (5):1097–1110, Mar. 2014. 43

P.-M. Lledo, M. Alonso, and M. S. Grubb. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(3):179–193, Mar. 2006. 59

D. J. Loane and A. Kumar. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Experimental Neurology*, 275 Pt 3:316–327, Jan. 2016. 14

C. Lois and A. Alvarez-Buylla. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5162):1145–1148, May 1994. 36

I. Lopategui Cabezas, A. Herrera Batista, and G. Pentón Rol. The role of glial cells in Alzheimer disease: potential therapeutic implications. *Neurología (Barcelona, Spain)*, 29 (5):305–309, June 2014. 14

M. B. Luskin and J. L. Price. The topographic organization of associational fibers of the olfactory system in the rat, including centrifugal fibers to the olfactory bulb. *The Journal of Comparative Neurology*, 216(3):264–291, May 1983. 30

F. Luzzati, S. D. Marchis, A. Fasolo, and P. Peretto. Neurogenesis in the Caudate Nucleus of the Adult Rabbit. *The Journal of Neuroscience*, 26(2):609–621, Jan. 2006. 50

A. Mackay-Sim. Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa. *Archives Italiennes De Biologie*, 148(2):47–58, June 2010. 24, 51

R. Maggi, J. Zasso, and L. Conti. Neurodevelopmental origin and adult neurogenesis of the neuroendocrine hypothalamus. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, Jan. 2015. 32

J. P. Magnusson, C. Göritz, J. Tatarishvili, D. O. Dias, E. M. K. Smith, O. Lindvall, Z. Kokaia, and J. Frisén. A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse. *Science*, 346(6206):237–241, Oct. 2014. 50

I. Mahar, F. R. Bambico, N. Mechawar, and J. N. Nobrega. Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 38:173–192, Jan. 2014. 46

M. Mancuso, A. Giovanetti, and E. B. Brittebo. Effects of dichlobenil on ultrastructural morphology and cell replication in the mouse olfactory mucosa. *Toxicologic Pathology*, 25 (2):186–194, Apr. 1997. 50

N. Mandairon, C. J. Ferretti, C. M. Stack, D. B. Rubin, T. A. Cleland, and C. Linster. Cholinergic modulation in the olfactory bulb influences spontaneous olfactory discrimination in adult rats. *The European Journal of Neuroscience*, 24(11):3234–3244, Dec. 2006. 29

A. Maresh, D. Rodriguez Gil, M. C. Whitman, and C. A. Greer. Principles of glomerular organization in the human olfactory bulb–implications for odor processing. *PloS One*, 3 (7):e2640, 2008. 116

F. O. Martinez and S. Gordon. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports*, 6, Mar. 2014. 8

J. L. Marín-Teva, I. Dusart, C. Colin, A. Gervais, N. van Rooijen, and M. Mallat. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron*, 41(4):535–547, Feb. 2004. 16

D. C. Mastellos. Complement emerges as a masterful regulator of CNS homeostasis, neural synaptic plasticity and cognitive function. *Experimental Neurology*, June 2014. 112, 113

P. Mathieu, D. Battista, A. Depino, V. Roca, M. Graciarena, and F. Pitossi. The more you have, the less you get: the functional role of inflammation on neuronal differentiation of endogenous and transplanted neural stem cells in the adult brain. *Journal of Neurochemistry*, 112(6):1368–1385, Mar. 2010a. 44

P. Mathieu, A. P. Piantanida, and F. Pitossi. Chronic expression of transforming growth factor-beta enhances adult neurogenesis. *Neuroimmunomodulation*, 17(3):200–201, 2010b. 44

S. Matsutani and N. Yamamoto. Centrifugal innervation of the mammalian olfactory bulb. *Anatomical Science International*, 83(4):218–227, Dec. 2008. 28, 29, 30

J. McAfoose and B. T. Baune. Evidence for a cytokine model of cognitive function. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33(3):355–366, Mar. 2009. 11

D. B. McKim, A. Niraula, A. J. Tarr, E. S. Wohleb, J. F. Sheridan, and J. P. Godbout. Neuroinflammatory Dynamics Underlie Memory Impairments after Repeated Social Defeat. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36(9): 2590–2604, Mar. 2016. 47

J. H. McLean and M. T. Shipley. Serotonergic afferents to the rat olfactory bulb: I. Origins and laminar specificity of serotonergic inputs in the adult rat. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 7(10):3016–3028, Oct. 1987. 28

J. H. McLean, M. T. Shipley, W. T. Nickell, G. Aston-Jones, and C. K. Reyher. Chemoanatomical organization of the noradrenergic input from locus coeruleus to the olfactory bulb of the adult rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 285(3):339–349, July 1989. 28

C. A. McPherson, B. A. Merrick, and G. J. Harry. In vivo molecular markers for pro-inflammatory cytokine M1 stage and resident microglia in trimethyltin-induced hippocampal injury. *Neurotoxicity Research*, 25(1):45–56, Jan. 2014. 8

N. Mechawar, A. Saghatelyan, R. Grailhe, L. Scoriels, G. Gheusi, M.-M. Gabellec, P.-M. Lledo, and J.-P. Changeux. Nicotinic receptors regulate the survival of newborn neurons in the adult olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(26):9822–9826, June 2004. 29

U. J. Meierhenrich, J. Golebiowski, X. Fernandez, and D. Cabrol-Bass. The molecular basis of olfactory chemoreception. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 43(47): 6410–6412, Dec. 2004. 23

S. Mejia-Gervacio, K. Murray, and P.-M. Lledo. NKCC1 controls GABAergic signaling and neuroblast migration in the postnatal forebrain. *Neural Dev*, 6(4):10–1186, 2011. 37

F. Mercier, J. T. Kitasako, and G. I. Hatton. Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *The Journal of Comparative Neurology*, 451(2):170–188, Sept. 2002. 35

F. T. Merkle, Z. Mirzadeh, and A. Alvarez-Buylla. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5836):381–384, July 2007. 35, 37, 41

F. T. Merkle, L. C. Fuentealba, T. A. Sanders, L. Magno, N. Kessaris, and A. Alvarez-Buylla. Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types. *Nature neuroscience*, 17(2):207–214, Feb. 2014. 35, 41

N. S. Merle, S. E. Church, V. Fremeaux-Bacchi, and L. T. Roumenina. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Frontiers in Immunology*, 6: 262, 2015. 19

J. Mestas and C. C. W. Hughes. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(5):2731–2738, Mar. 2004. 115

A. Mildner, H. Schmidt, M. Nitsche, D. Merkler, U.-K. Hanisch, M. Mack, M. Heikenwalder, W. Brück, J. Priller, and M. Prinz. Microglia in the adult brain arise from Ly-6chiccr2+ monocytes only under defined host conditions. *Nature Neuroscience*, 10(12):1544–1553, Dec. 2007. 5

A. Mildner, M. Mack, H. Schmidt, W. Brück, M. Djukic, M. D. Zabel, A. Hille, J. Priller, and M. Prinz. CCR2+Ly-6chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. *Brain: A Journal of Neurology*, 132(Pt 9):2487–2500, Sept. 2009. 6

G.-l. Ming and H. Song. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, 28:223–250, 2005. 33

M. Mittelbronn, K. Dietz, H. J. Schluesener, and R. Meyermann. Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathologica*, 101(3):249–255, Mar. 2001. 9

K. Miyamichi, F. Amat, F. Moussavi, C. Wang, I. Wickersham, N. R. Wall, H. Taniguchi, B. Tasic, Z. J. Huang, Z. He, E. M. Callaway, M. A. Horowitz, and L. Luo. Cortical representations of olfactory input by transsynaptic tracing. *Nature*, 472(7342):191–196, Apr. 2011. 26

A. Mizrahi. Dendritic development and plasticity of adult-born neurons in the mouse olfactory bulb. *Nature Neuroscience*, 10(4):444–452, Apr. 2007. 39

M. Mizutani, P. A. Pino, N. Saederup, I. F. Charo, R. M. Ransohoff, and A. E. Cardona. The Fractalkine Receptor but Not CCR2 Is Present on Microglia from Embryonic Development throughout Adulthood. *The Journal of Immunology*, 188(1):29–36, Jan. 2012. 14

J. Mocco, W. J. Mack, A. F. Ducruet, S. A. Sosunov, M. E. Sughrue, B. G. Hassid, M. N. Nair, I. Laufer, R. J. Komotar, M. Claire, H. Holland, D. J. Pinsky, and E. S. Connolly. Complement component C3 mediates inflammatory injury following focal cerebral ischemia. *Circulation Research*, 99(2):209–217, July 2006. 19

P. Mohapel, C. T. Ekdahl, and O. Lindvall. Status epilepticus severity influences the long-term outcome of neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Neurobiology of Disease*, 15(2): 196–205, Mar. 2004. 45

P. Mombaerts. Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5440):707–711, Oct. 1999. 23

M. L. Monje, H. Toda, and T. D. Palmer. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5651):1760–1765, Dec. 2003. 44

S. C. Morgan, D. L. Taylor, and J. M. Pocock. Microglia release activators of neuronal proliferation mediated by activation of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and delta–Notch signalling cascades. *Journal of Neurochemistry*, 90(1):89–101, July 2004. 14

K. Mori and H. Sakano. How is the olfactory map formed and interpreted in the mammalian brain? *Annual Review of Neuroscience*, 34:467–499, 2011. 23, 26, 27

K. Mori, K. Kishi, and H. Ojima. Distribution of dendrites of mitral, displaced mitral, tufted, and granule cells in the rabbit olfactory bulb. *The Journal of Comparative Neurology*, 219 (3):339–355, Sept. 1983. 41

K. Mori, H. Nagao, and Y. Yoshihara. The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5440):711–715, Oct. 1999. 24

T. Moriizumi, T. Tsukatani, H. Sakashita, and T. Miwa. Olfactory disturbance induced by deafferentation of serotonergic fibers in the olfactory bulb. *Neuroscience*, 61(4):733–738, Aug. 1994. 28

S. J. Morrison and A. C. Spradling. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*, 132(4):598–611, Feb. 2008. 32

F. Murray, D. W. Smith, and P. H. Hutson. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. *European Journal of Pharmacology*, 583(1):115–127, Mar. 2008. 80

N. Müller and M. J. Schwarz. The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. *Molecular Psychiatry*, 12(11):988–1000, Nov. 2007. 47

K. Nagata, K. Nakajima, N. Takemoto, H. Saito, and S. Kohsaka. Microglia-derived plasminogen enhances neurite outgrowth from explant cultures of rat brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 11(2):227–237, Apr. 1993. 14

S. Nagayama, Y. K. Takahashi, Y. Yoshihara, and K. Mori. Mitral and tufted cells differ in the decoding manner of odor maps in the rat olfactory bulb. *Journal of Neurophysiology*, 91(6):2532–2540, June 2004. 26

S. Najjar, D. M. Pearlman, K. Alper, A. Najjar, and O. Devinsky. Neuroinflammation and psychiatric illness. *Journal of Neuroinflammation*, 10:43, 2013. 46

M. Nakanishi, T. Niidome, S. Matsuda, A. Akaike, T. Kihara, and H. Sugimoto. Microglia-derived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells. *European Journal of Neuroscience*, 25(3):649–658, Feb. 2007. 16

C. Nathan and A. Ding. Nonresolving inflammation. *Cell*, 140(6):871–882, Mar. 2010. 45

S. Negoias, I. Croy, J. Gerber, S. Puschmann, K. Petrowski, P. Joraschky, and T. Hummel. Reduced olfactory bulb volume and olfactory sensitivity in patients with acute major depression. *Neuroscience*, 169(1):415–421, Aug. 2010. 47, 80, 117

M. D. Neher, M. C. Rich, C. N. Keene, S. Weckbach, A. L. Bolden, J. T. Losacco, J. Patane, M. A. Flierl, L. Kulik, V. M. Holers, and P. F. Stahel. Deficiency of complement receptors CR2/CR1 in Cr2-/- mice reduces the extent of secondary brain damage after closed head injury. *Journal of neuroinflammation*, 11(1):95, May 2014. 19

K. R. Neville and L. B. Haberly. Olfactory cortex. *The synaptic organization of the brain*, 5: 415–454, 2004. 26, 27

K. T. Nguyen-Ba-Charvet, N. Picard-Riera, M. Tessier-Lavigne, A. Baron-Van Evercooren, C. Sotelo, and A. Chédotal. Multiple roles for slits in the control of cell migration in the rostral migratory stream. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(6):1497–1506, Feb. 2004. 38

R. S. J. Nicholas, M. G. Wing, and A. Compston. Nonactivated microglia promote oligodendrocyte precursor survival and maturation through the transcription factor NF-kappaB. *European Journal of Neuroscience*, 13(5):959–967, Mar. 2001. 16

M. Nilsson, E. Perfilieva, U. Johansson, O. Orwar, and P. S. Eriksson. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *Journal of neurobiology*, 39(4):569–578, 1999. 45

A. Nimmerjahn, F. Kirchhoff, and F. Helmchen. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5726):1314–1318, May 2005. 2, 10, 11, 17

A. Nishiyori, M. Minami, Y. Ohtani, S. Takami, J. Yamamoto, N. Kawaguchi, T. Kume, A. Akaike, and M. Satoh. Localization of fractalkine and CX3cr1 mRNAs in rat brain: does fractalkine play a role in signaling from neuron to microglia? *FEBS Letters*, 429(2): 167–172, June 1998. 14

D. M. Norden, P. J. Trojanowski, E. Villanueva, E. Navarro, and J. P. Godbout. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia*, 64(2):300–316, Feb. 2016. 13

C. Noto, L. B. Rizzo, R. B. Mansur, R. S. McIntyre, M. Maes, and E. Brietzke. Targeting the inflammatory pathway as a therapeutic tool for major depression. *Neuroimmunomodulation*, 21(2-3):131–139, 2014. 46

A. Nunez-Parra, R. K. Maurer, K. Krahe, R. S. Smith, and R. C. Araneda. Disruption of centrifugal inhibition to olfactory bulb granule cells impairs olfactory discrimination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(36): 14777–14782, Sept. 2013. 29

S. A. O'Barr, J. Caguioa, D. Gruol, G. Perkins, J. A. Ember, T. Hugli, and N. R. Cooper. Neuronal expression of a functional receptor for the C5a complement activation fragment. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 166(6):4154–4162, Mar. 2001. 21

P. J. Ocbina, M. L. V. Dizon, L. Shin, and F. G. Szele. Doublecortin is necessary for the migration of adult subventricular zone cells from neurospheres. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 33(2):126–135, Oct. 2006. 37

G. Ohloff. *Scent and fragrances. The fascination of odors and their chemical perspectives.* Springer-Verlag, 1994. 22

H. Ojima, T. Yamasaki, H. Kojima, and A. Akashi. Cholinergic innervation of the main and the accessory olfactory bulbs of the rat as revealed by a monoclonal antibody against choline acetyltransferase. *Anatomy and Embryology*, 178(6):481–488, 1988. 28

G. C. O'Keeffe, P. Tyers, D. Aarsland, J. W. Dalley, R. A. Barker, and M. A. Caldwell. Dopamine-induced proliferation of adult neural precursor cells in the mammalian subventricular zone is mediated through EGF. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(21):8754–8759, May 2009. 48

J. O'Kusky and P. Ye. Neurodevelopmental effects of insulin-like growth factor signaling. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 33(3):230–251, Aug. 2012. 16

R. W. Oppenheim. Cell Death During Development of the Nervous System. *Annual Review of Neuroscience*, 14(1):453–501, 1991. 11, 16

R. Orihuela, C. A. McPherson, and G. J. Harry. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *British Journal of Pharmacology*, 173(4):649–665, Feb. 2016. 8, 9

E. Orona, J. W. Scott, and E. C. Rainer. Different granule cell populations innervate superficial and deep regions of the external plexiform layer in rat olfactory bulb. *The Journal of Comparative Neurology*, 217(2):227–237, June 1983. 41

D. Orsucci, V. Calsolaro, M. Mancuso, and G. Siciliano. Neuroprotective effects of tetracyclines: molecular targets, animal models and human disease. *CNS & neurological disorders drug targets*, 8(3):222–231, June 2009. 111

J. Pager. Ascending olfactory information and centrifugal influxes contributing to a nutritional modulation of the rat mitral cell responses. *Brain Research*, 140(2):251–269, Jan. 1978. 30

J. Pager, I. Giachetti, A. Holley, and J. Le Magnen. A selective control of olfactory bulb electrical activity in relation to food deprivation and satiety in rats. *Physiology & Behavior*, 9(4):573–579, Oct. 1972. 30

M. Pallotto, A. Nissant, J.-M. Fritschy, U. Rudolph, M. Sassoè-Pognetto, P. Panzanelli, and P.-M. Lledo. Early formation of GABAergic synapses governs the development of adult-born neurons in the olfactory bulb. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(26):9103–9115, June 2012. 39, 42, 102, 103

P. Panzanelli, C. Bardy, A. Nissant, M. Pallotto, M. Sassoè-Pognetto, P.-M. Lledo, and J.-M. Fritschy. Early synapse formation in developing interneurons of the adult olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(48): 15039–15052, Dec. 2009. 39

R. C. Paolicelli, G. Bolasco, F. Pagani, L. Maggi, M. Scianni, P. Panzanelli, M. Giustetto, T. A. Ferreira, E. Guiducci, L. Dumas, D. Ragozzino, and C. T. Gross. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science (New York, N.Y.)*, 333 (6048):1456–1458, Sept. 2011. 17

J. M. Parent, T. W. Yu, R. T. Leibowitz, D. H. Geschwind, R. S. Sloviter, and D. H. Lowenstein. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(10):3727–3738, May 1997. 45

S. Parrish-Aungst, E. Kiyokage, G. Szabo, Y. Yanagawa, M. T. Shipley, and A. C. Puche. Sensory experience selectively regulates transmitter synthesis enzymes in interglomerular circuits. *Brain Research*, 1382:70–76, Mar. 2011. 43

B. M. Pause, A. Miranda, R. Göder, J. B. Aldenhoff, and R. Ferstl. Reduced olfactory performance in patients with major depression. *Journal of Psychiatric Research*, 35(5): 271–277, Sept. 2001. 47, 80, 117

M. Perez-Alcazar, J. Daborg, A. Stokowska, P. Wasling, A. Björefeldt, M. Kalm, H. Zetterberg, K. E. Carlström, K. Blomgren, C. T. Ekdahl, E. Hanse, and M. Pekna. Altered cognitive performance and synaptic function in the hippocampus of mice lacking C3. *Experimental Neurology*, 253:154–164, Mar. 2014. 96, 113

V. H. Perry, D. A. Hume, and S. Gordon. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience*, 15(2):313–326, June 1985. 6

L. Petreanu and A. Alvarez-Buylla. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(14):6106–6113, July 2002. 36, 38, 39, 42

M. L. Pfau and S. J. Russo. Neuroinflammation Regulates Cognitive Impairment in Socially Defeated Mice. *Trends in Neurosciences*, Apr. 2016. 47

J. M. Pocock and H. Kettenmann. Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends in Neurosciences*, 30(10):527–535, Oct. 2007. 17

E. Polazzi and B. Monti. Microglia and neuroprotection: from in vitro studies to therapeutic applications. *Progress in Neurobiology*, 92(3):293–315, Nov. 2010. 44, 45

M. C. Pott Godoy, R. Tarelli, C. C. Ferrari, M. I. Sarchi, and F. J. Pitossi. Central and systemic IL-1 exacerbates neurodegeneration and motor symptoms in a model of Parkinson's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, 131(Pt 7):1880–1894, July 2008. 14

R. T. Pressler, T. Inoue, and B. W. Strowbridge. Muscarinic receptor activation modulates granule cell excitability and potentiates inhibition onto mitral cells in the rat olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(41):10969–10981, Oct. 2007. 29

J. L. Price and T. P. Powell. An electron-microscopic study of the termination of the afferent fibres to the olfactory bulb from the cerebral hemisphere. *Journal of Cell Science*, 7(1): 157–187, July 1970a. 30

J. L. Price and T. P. Powell. An experimental study of the origin and the course of the centrifugal fibres to the olfactory bulb in the rat. *Journal of Anatomy*, 107(Pt 2):215–237, Sept. 1970b. 29

J. Priller, A. Flügel, T. Wehner, M. Boentert, C. A. Haas, M. Prinz, F. Fernandez-Klett, K. Prass, I. Bechmann, B. A. de Boer, M. Frotscher, G. W. Kreutzberg, D. A. Persons, and U. Dirnagl. Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: Use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nature Medicine*, 7(12): 1356–1361, Dec. 2001. 5

M. Prinz and A. Mildner. Microglia in the CNS: immigrants from another world. *Glia*, 59 (2):177–187, Feb. 2011. 6

M. Prinz and J. Priller. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 15(5):300–312, May 2014. 14

K. R. Pritchett-Corning, J. Cosentino, and C. B. Clifford. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats. *Laboratory Animals*, 43(2):165–173, Apr. 2009. 116

Y. Rahpeymai, M. A. Hietala, U. Wilhelmsson, A. Fotheringham, I. Davies, A.-K. Nilsson, J. Zwirner, R. A. Wetsel, C. Gerard, M. Pekny, and M. Pekna. Complement: a novel factor in basal and ischemia-induced neurogenesis. *The EMBO journal*, 25(6):1364–1374, Mar. 2006. 21

V. Ramaglia, T. R. Hughes, R. M. Donev, M. M. Ruseva, X. Wu, I. Huitinga, F. Baas, J. W. Neal, and B. P. Morgan. C3-dependent mechanism of microglial priming relevant to multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(3):965–970, Jan. 2012. 19

S. Ramon y Cajal. Algo sobre la significacióin fisiológica de la neuroglía. (2):215–315, 1897. 2

R. M. Ransohoff and M. A. Brown. Innate immunity in the central nervous system. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(4):1164–1171, Apr. 2012. 8

R. M. Ransohoff and A. E. Cardona. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature*, 468(7321):253–262, Nov. 2010. 8

R. M. Ransohoff and V. H. Perry. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annual Review of Immunology*, 27:119–145, 2009. 8

N. Ravel, A. Elaagouby, and R. Gervais. Scopolamine injection into the olfactory bulb impairs short-term olfactory memory in rats. *Behavioral Neuroscience*, 108(2):317–324, Apr. 1994. 29

C. K. Reyher, W. K. Schwerdtfeger, and H. G. Baumgarten. Interbulbar axonal collateralization and morphology of anterior olfactory nucleus neurons in the rat. *Brain Research Bulletin*, 20(5):549–566, May 1988. 29, 30

M. C. Rich, C. N. Keene, M. D. Neher, K. Johnson, Z.-X. Yu, A. Ganivet, V. M. Holers, and P. F. Stahel. Site-targeted complement inhibition by a complement receptor 2-conjugated inhibitor (mTT30) ameliorates post-injury neuropathology in mouse brains. *Neuroscience Letters*, 617:188–194, Mar. 2016. 19

D. Ricklin and J. D. Lambris. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 190(8):3831–3838, Apr. 2013. 19

S. Rivest. The promise of anti-inflammatory therapies for CNS injuries and diseases. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 11(6):783–786, June 2011. 45

C. Rochefort, G. Gheusi, J.-D. Vincent, and P.-M. Lledo. Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(7): 2679–2689, Apr. 2002. 42

N. Ron-Harel, M. Cardon, and M. Schwartz. Brain homeostasis is maintained by "danger" signals stimulating a supportive immune response within the brain's borders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(5):1036–1043, July 2011. 45

J. D. Rosenblat, D. S. Cha, R. B. Mansur, and R. S. McIntyre. Inflamed moods: A review of the interactions between inflammation and mood disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 53:23–34, Aug. 2014. 46

M. Rothermel, R. M. Carey, A. Puche, M. T. Shipley, and M. Wachowiak. Cholinergic inputs from Basal forebrain add an excitatory bias to odor coding in the olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(13): 4654–4664, Mar. 2014. 29

I. Russo, P. Amornphimoltham, R. Weigert, S. Barlati, and F. Bosetti. Cyclooxygenase-1 is involved in the inhibition of hippocampal neurogenesis after lipopolysaccharide-induced neuroinflammation. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 10(15):2568–2573, Aug. 2011. 44

S. F. Rymo, H. Gerhardt, F. W. Sand, R. Lang, A. Uv, and C. Betsholtz. A Two-Way Communication between Microglial Cells and Angiogenic Sprouts Regulates Angiogenesis in Aortic Ring Cultures. *PLOS ONE*, 6(1):e15846, Jan. 2011. 16

A. Saghatelyan, A. de Chevigny, M. Schachner, and P.-M. Lledo. Tenascin-R mediates activity-dependent recruitment of neuroblasts in the adult mouse forebrain. *Nature Neuroscience*, 7(4):347–356, Apr. 2004. 38, 41

A. Saghatelyan, P. Roux, M. Migliore, C. Rochefort, D. Desmaisons, P. Charneau, G. M. Shepherd, and P.-M. Lledo. Activity-dependent adjustments of the inhibitory network in the olfactory bulb following early postnatal deprivation. *Neuron*, 46(1):103–116, Apr. 2005. 42

B. Saha, A. R. Ypsilanti, C. Boutin, H. Cremer, and A. Chédotal. Plexin-B2 regulates the proliferation and migration of neuroblasts in the postnatal and adult subventricular zone. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(47): 16892–16905, Nov. 2012. 38, 39

S. Saino-Saito, J. W. Cave, Y. Akiba, H. Sasaki, K. Goto, K. Kobayashi, R. Berlin, and H. Baker. ER81 and CaMKIV identify anatomically and phenotypically defined subsets of mouse olfactory bulb interneurons. *The Journal of Comparative Neurology*, 502(4):485–496, June 2007. 41

M. Sakamoto, R. Kageyama, and I. Imayoshi. The functional significance of newly born neurons integrated into olfactory bulb circuits. *Neurogenesis*, 8:121, 2014. 41, 60

N. Sanai, T. Nguyen, R. A. Ihrie, Z. Mirzadeh, H.-H. Tsai, M. Wong, N. Gupta, M. S. Berger, E. Huang, J.-M. Garcia-Verdugo, D. H. Rowitch, and A. Alvarez-Buylla. Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature*, 478(7369): 382–386, Oct. 2011. 49, 117

L. Santarelli, M. Saxe, C. Gross, A. Surget, F. Battaglia, S. Dulawa, N. Weisstaub, J. Lee, R. Duman, O. Arancio, C. Belzung, and R. Hen. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5634):805–809, Aug. 2003. 46

M. Sassoé-Pognetto, J. K. Utvik, P. Camoletto, M. Watanabe, F. A. Stephenson, D. S. Bredt, and O. P. Ottersen. Organization of postsynaptic density proteins and glutamate receptors in axodendritic and dendrodendritic synapses of the rat olfactory bulb. *The Journal of Comparative Neurology*, 463(3):237–248, Aug. 2003. 29

M. Sawada, N. Kaneko, H. Inada, H. Wake, Y. Kato, Y. Yanagawa, K. Kobayashi, T. Nemoto, J. Nabekura, and K. Sawamoto. Sensory input regulates spatial and subtype-specific patterns of neuronal turnover in the adult olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(32):11587–11596, Aug. 2011. 42

S. J. Schachtele, J. Losh, M. E. Dailey, and S. H. Green. Spine Formation and Maturation in the Developing Rat Auditory Cortex. *The Journal of comparative neurology*, 519(16): 3327–3345, Nov. 2011. 104

D. P. Schafer and B. Stevens. Microglia Function in Central Nervous System Development and Plasticity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(10):a020545, Oct. 2015. 17

D. P. Schafer, E. K. Lehrman, A. G. Kautzman, R. Koyama, A. R. Mardinly, R. Yamasaki, R. M. Ransohoff, M. E. Greenberg, B. A. Barres, and B. Stevens. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*, 74(4):691–705, May 2012. 102, 114

H. Schneider, F. Pitossi, D. Balschun, A. Wagner, A. del Rey, and H. O. Besedovsky. A neuromodulatory role of interleukin-1beta in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(13):7778–7783, June 1998. 11

G. Schoenbaum and H. Eichenbaum. Information coding in the rodent prefrontal cortex. II. Ensemble activity in orbitofrontal cortex. *Journal of Neurophysiology*, 74(2):751–762, Aug. 1995a. 30

G. Schoenbaum and H. Eichenbaum. Information coding in the rodent prefrontal cortex. I. Single-neuron activity in orbitofrontal cortex compared with that in pyriform cortex. *Journal of Neurophysiology*, 74(2):733–750, Aug. 1995b. 30

T. A. Schoenfeld and F. Macrides. Topographic organization of connections between the main olfactory bulb and pars externa of the anterior olfactory nucleus in the hamster. *Journal of Comparative Neurology*, 227(1):121–135, 1984. 26

C. Schulz, E. Gomez Perdiguero, L. Chorro, H. Szabo-Rogers, N. Cagnard, K. Kierdorf, M. Prinz, B. Wu, S. E. W. Jacobsen, J. W. Pollard, J. Frampton, K. J. Liu, and F. Geissmann. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6077):86–90, Apr. 2012. 4

F. Sedel, C. Béchade, S. Vyas, and A. Triller. Macrophage-Derived Tumor Necrosis Factor alpha, an Early Developmental Signal for Motoneuron Death. *The Journal of Neuroscience*, 24(9):2236–2246, Mar. 2004. 16

B. Seri, J. M. García-Verdugo, B. S. McEwen, and A. Alvarez-Buylla. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(18):7153–7160, Sept. 2001. 34

R. Shechter and M. Schwartz. CNS sterile injury: just another wound healing? *Trends in Molecular Medicine*, 19(3):135–143, Mar. 2013. 8

R. Shechter, A. London, C. Varol, C. Raposo, M. Cusimano, G. Yovel, A. Rolls, M. Mack, S. Pluchino, G. Martino, S. Jung, and M. Schwartz. Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS medicine*, 6(7):e1000113, July 2009. 44

Q. Shen, Y. Wang, E. Kokovay, G. Lin, S.-M. Chuang, S. K. Goderie, B. Roysam, and S. Temple. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: A quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell stem cell*, 3(3):289–300, Sept. 2008. 35

G. M. Shepherd and C. A. Greer. Olfactory bulb. 1998. 29

Q. Shi, K. J. Colodner, S. B. Matousek, K. Merry, S. Hong, J. E. Kenison, J. L. Frost, K. X. Le, S. Li, J.-C. Dodart, B. J. Caldarone, B. Stevens, and C. A. Lemere. Complement C3-Deficient Mice Fail to Display Age-Related Hippocampal Decline. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(38):13029–13042, Sept. 2015. 96, 99, 101, 113, 114

Y. Shigemoto-Mogami, K. Hoshikawa, J. E. Goldman, Y. Sekino, and K. Sato. Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(6): 2231–2243, Feb. 2014. 16

R.-H. Shih, C.-Y. Wang, and C.-M. Yang. NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 8, Dec. 2015. 8

M. T. Shipley, F. J. Halloran, and J. de la Torre. Surprisingly rich projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *Brain Research*, 329(1-2):294–299, Mar. 1985. 28

H. Shoji, K. Takao, S. Hattori, and T. Miyakawa. Age-related changes in behavior in C57bl/6j mice from young adulthood to middle age. *Molecular Brain*, 9, Jan. 2016. 100

A. Sica and A. Mantovani. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(3):787–795, Mar. 2012. 9

A. Sierra, J. M. Encinas, J. J. P. Deudero, J. H. Chancey, G. Enikolopov, L. S. Overstreet-Wadiche, S. E. Tsirka, and M. Maletic-Savatic. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*, 7(4):483–495, Oct. 2010. 18, 44

A. Sierra, O. Abiega, A. Shahraz, and H. Neumann. Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7:6, 2013. 44, 45

A. Sierra, S. Beccari, I. Diaz-Aparicio, J. M. Encinas, S. Comeau, and M.-E. Tremblay. Surveillance, Phagocytosis, and Inflammation: How Never-Resting Microglia Influence Adult Hippocampal Neurogenesis. *Neural plasticity*, 2014:610343, 2014. 11, 45, 61

C. S. Silva Teixeira, N. M. F. S. A. Cerqueira, and A. C. Silva Ferreira. Unravelling the Olfactory Sense: From the Gene to Odor Perception. *Chemical Senses*, 41(2):105–121, Feb. 2016. 23

T. Simuni and K. Sethi. Nonmotor manifestations of Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 64 Suppl 2:S65–80, Dec. 2008. 47

E. Siopi, M. Denizet, M.-M. Gabellec, F. de Chaumont, J.-C. Olivo-Marin, J.-P. Guilloux, P.-M. Lledo, and F. Lazarini. Anxiety- and Depression-Like States Lead to Pronounced Olfactory Deficits and Impaired Adult Neurogenesis in Mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36(2):518–531, Jan. 2016. 47, 56

M. Snapyan, M. Lemasson, M. S. Brill, M. Blais, M. Massouh, J. Ninkovic, C. Gravel, F. Berthod, M. Götz, P. A. Barker, A. Parent, and A. Saghatelyan. Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(13):4172–4188, Apr. 2009. 37

J. S. Snyder, A. Soumier, M. Brewer, J. Pickel, and H. A. Cameron. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature*, 476(7361):458–461, Aug. 2011. 80

H. Song, C. F. Stevens, and F. H. Gage. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*, 417(6884):39–44, May 2002. 34

Z. Sołtys, M. Ziaja, R. Pawliński, Z. Setkowicz, and K. Janeczko. Morphology of reactive microglia in the injured cerebral cortex. Fractal analysis and complementary quantitative methods. *Journal of Neuroscience Research*, 63(1):90–97, Jan. 2001. 10

K. L. Spalding, O. Bergmann, K. Alkass, S. Bernard, M. Salehpour, H. B. Huttner, E. Boström, I. Westerlund, C. Vial, B. A. Buchholz, G. Possnert, D. C. Mash, H. Druid, and J. Frisén. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*, 153(6):1219–1227, June 2013. 49

P. Squarzoni, G. Oller, G. Hoeffel, L. Pont-Lezica, P. Rostaing, D. Low, A. Bessis, F. Ginhoux, and S. Garel. Microglia Modulate Wiring of the Embryonic Forebrain. *Cell Reports*, 8(5):1271–1279, Sept. 2014. 17

M. Stein, S. Keshav, N. Harris, and S. Gordon. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 176(1):287–292, July 1992. 8

R. Steinfeld, J. T. Herb, R. Sprengel, A. T. Schaefer, and I. Fukunaga. Divergent innervation of the olfactory bulb by distinct raphe nuclei. *The Journal of Comparative Neurology*, 523(5):805–813, Apr. 2015. 28

N. Stence, M. Waite, and M. E. Dailey. Dynamics of microglial activation: A confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*, 33(3):256–266, Mar. 2001. 10

A. H. Stephan, B. A. Barres, and B. Stevens. The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annual Review of Neuroscience*, 35:369–389, 2012. 21

D. D. Stettler and R. Axel. Representations of odor in the piriform cortex. *Neuron*, 63(6):854–864, 2009. 27

B. Stevens, N. J. Allen, L. E. Vazquez, G. R. Howell, K. S. Christopherson, N. Nouri, K. D. Micheva, A. K. Mehalow, A. D. Huberman, B. Stafford, A. Sher, A. M. Litke, J. D. Lambris, S. J. Smith, S. W. M. John, and B. A. Barres. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*, 131(6):1164–1178, Dec. 2007. 21, 101

J. Stiles and T. L. Jernigan. The Basics of Brain Development. *Neuropsychology Review*, 20 (4):327–348, Dec. 2010. 31

W. J. Streit. Microglial Response to Brain Injury: A Brief Synopsis. *Toxicologic Pathology*, 28(1):28–30, Jan. 2000. 10

K. T. Sultan, K. N. Brown, and S.-H. Shi. Production and organization of neocortical interneurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, Nov. 2013. 31

M. F. Tarttelin and R. A. Gorski. Variations in food and water intake in the normal and acyclic female rat. *Physiology & Behavior*, 7(6):847–852, Dec. 1971. 115

V. Tepavčević, F. Lazarini, C. Alfaro-Cervello, C. Kerninon, K. Yoshikawa, J. M. Garcia-Verdugo, P.-M. Lledo, B. Nait-Oumesmar, and A. Baron-Van Evercooren. Inflammation-induced subventricular zone dysfunction leads to olfactory deficits in a targeted mouse model of multiple sclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(12):4722–4734, Dec. 2011. 56

K. Toida, K. Kosaka, C. W. Heizmann, and T. Kosaka. Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb: III. Structural features of calbindin D28k-immunoreactive neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, 392(2):179–198, Mar. 1998. 26

K. Toida, K. Kosaka, Y. Aika, and T. Kosaka. Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb—IV. Intraglomerular synapses of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons. *Neuroscience*, 101(1):11–17, Oct. 2000. 26

A. B. Tonchev, T. Yamashima, K. Sawamoto, and H. Okano. Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia. *Journal of Neuroscience Research*, 81(6):776–788, Sept. 2005. 50

C. K. Tong, Y.-G. Han, J. K. Shah, K. Obernier, C. D. Guinto, and A. Alvarez-Buylla. Primary cilia are required in a unique subpopulation of neural progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(34):12438–12443, Aug. 2014. 35

T. A. Tran, A. D. Nguyen, J. Chang, M. S. Goldberg, J.-K. Lee, and M. G. Tansey. Lipopolysaccharide and tumor necrosis factor regulate Parkin expression via nuclear factor-kappa B. *PloS One*, 6(8):e23660, 2011. 13

M.-E. Tremblay. The role of microglia at synapses in the healthy CNS: novel insights from recent imaging studies. *Neuron Glia Biology*, 7(1):67–76, Feb. 2011. 10, 17

M.-E. Tremblay, R. L. Lowery, and A. K. Majewska. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS biology*, 8(11):e1000527, 2010. 17

M.-E. Tremblay, C. Lecours, L. Samson, V. Sánchez-Zafra, and A. Sierra. From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9:45, 2015. 2

H. Tsiang, A. Koulakoff, B. Bizzini, and Y. Berwald-Netter. Neurotropism of rabies virus. An in vitro study. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 42(4):439–452, July 1983. 12

R. J. Tynan, S. Naicker, M. Hinwood, E. Nalivaiko, K. M. Buller, D. V. Pow, T. A. Day, and F. R. Walker. Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(7):1058–1068, Oct. 2010. 13

M. Ueno, Y. Fujita, T. Tanaka, Y. Nakamura, J. Kikuta, M. Ishii, and T. Yamashita. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nature Neuroscience*, 16(5):543–551, May 2013. 14

E. R. Unger, J. H. Sung, J. C. Manivel, M. L. Chenggis, B. R. Blazar, and W. Krivit. Male donor-derived cells in the brains of female sex-mismatched bone marrow transplant recipients: a Y-chromosome specific in situ hybridization study. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 52(5):460–470, Sept. 1993. 5

N. Unoki, T. Murakami, K. Nishijima, K. Ogino, N. v. Rooijen, and N. Yoshimura. SDF-1/CXCR4 Contributes to the Activation of Tip Cells and Microglia in Retinal Angiogenesis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(7):3362–3371, July 2010. 16

M. T. Valley, L. G. Henderson, S. A. Inverso, and P.-M. Lledo. Adult neurogenesis produces neurons with unique GABAergic synapses in the olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(37):14660–14665, Sept. 2013. 60

L. Varela-Nallar and N. C. Inestrosa. Wnt signaling in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7:100, 2013. 33

D. L. Vaux and S. J. Korsmeyer. Cell Death in Development. *Cell*, 96(2):245–254, Jan. 1999. 11, 16

S. A. Villalta, H. X. Nguyen, B. Deng, T. Gotoh, and J. G. Tidball. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 18(3):482–496, Feb. 2009. 8

S. C. Vlad, D. R. Miller, N. W. Kowall, and D. T. Felson. Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. *Neurology*, 70(19):1672–1677, May 2008. 13

R. R. Waclaw, Z. J. Allen, S. M. Bell, F. Erdélyi, G. Szabó, S. S. Potter, and K. Campbell. The zinc finger transcription factor Sp8 regulates the generation and diversity of olfactory bulb interneurons. *Neuron*, 49(4):503–516, Feb. 2006. 41

H. Wake, A. J. Moorhouse, S. Jinno, S. Kohsaka, and J. Nabekura. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 29 (13):3974–3980, Apr. 2009. 17

A. K. Walker, A. Kavelaars, C. J. Heijnen, and R. Dantzer. Neuroinflammation and comorbidity of pain and depression. *Pharmacological Reviews*, 66(1):80–101, 2014. 46

N. M. Walton, B. M. Sutter, E. D. Laywell, L. H. Levkoff, S. M. Kearns, G. P. Marshall, B. Scheffler, and D. A. Steindler. Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia*, 54(8):815–825, Dec. 2006. 18

C. Wang, F. Liu, Y.-Y. Liu, C.-H. Zhao, Y. You, L. Wang, J. Zhang, B. Wei, T. Ma, Q. Zhang, Y. Zhang, R. Chen, H. Song, and Z. Yang. Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell Research*, 21(11):1534–1550, Nov. 2011. 49

D. Weintraub, J. Doshi, D. Koka, C. Davatzikos, A. D. Siderowf, J. E. Duda, D. A. Wolk, P. J. Moberg, S. X. Xie, and C. M. Clark. Neurodegeneration across stages of cognitive decline in Parkinson disease. *Archives of Neurology*, 68(12):1562–1568, Dec. 2011. 47

M. C. Whitman and C. A. Greer. Synaptic integration of adult-generated olfactory bulb granule cells: basal axodendritic centrifugal input precedes apical dendrodendritic local circuits. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(37):9951–9961, Sept. 2007. 29, 39

L. L. Williamson, A. Chao, and S. D. Bilbo. Environmental enrichment alters glial antigen expression and neuroimmune function in the adult rat hippocampus. *Brain, behavior, and immunity*, 26(3):500–510, 2012. 45

D. A. Wilson, W. Xu, B. Sadrian, E. Courtiol, Y. Cohen, and D. C. Barnes. Cortical Odor Processing in Health and Disease. *Progress in brain research*, 208:275–305, 2014. 27

B. Winner and J. Winkler. Adult Neurogenesis in Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(4):a021287, Apr. 2015. 48

B. Winner, D. C. Lie, E. Rockenstein, R. Aigner, L. Aigner, E. Masliah, H. G. Kuhn, and J. Winkler. Human wild-type alpha-synuclein impairs neurogenesis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 63(11):1155–1166, Nov. 2004. 48

E. S. Wohleb, N. D. Powell, J. P. Godbout, and J. F. Sheridan. Stress-induced recruitment of bone marrow-derived monocytes to the brain promotes anxiety-like behavior. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(34):13820–13833, Aug. 2013. 13

E. S. Wohleb, D. B. McKim, D. T. Shea, N. D. Powell, A. J. Tarr, J. F. Sheridan, and J. P. Godbout. Re-establishment of anxiety in stress-sensitized mice is caused by monocyte trafficking from the spleen to the brain. *Biological Psychiatry*, 75(12):970–981, June 2014. 13, 46

Y. Wolf, S. Yona, K.-W. Kim, and S. Jung. Microglia, seen from the CX3cr1 angle. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7:26, 2013. 14

M. H. Won, T. Ohno, J. G. Suh, J. C. Lee, S. M. Jo, Y. S. Oh, T. Namikawa, and J. Kitoh. Serotonergic neurons are present and innervate blood vessels in the olfactory bulb of the laboratory shrew, Suncus murinus. *Neuroscience Letters*, 243(1-3):53–56, Feb. 1998. 28

Y. Wu, L. Dissing-Olesen, B. A. MacVicar, and B. Stevens. Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends in Immunology*, 36(10):605–613, Oct. 2015. 61

F. Xie, C. Fang, N. Schnittke, J. E. Schwob, and X. Ding. Mechanisms of permanent loss of olfactory receptor neurons induced by the herbicide 2,6-dichlorobenzonitrile: effects on stem cells and noninvolvement of acute induction of the inflammatory cytokine IL-6. *Toxicology and applied pharmacology*, 272(3):598–607, Nov. 2013. 50

J. Xu, L. Zhu, S. He, Y. Wu, W. Jin, T. Yu, J. Y. Qu, and Z. Wen. Temporal-Spatial Resolution Fate Mapping Reveals Distinct Origins for Embryonic and Adult Microglia in Zebrafish. *Developmental Cell*, 34(6):632–641, Sept. 2015. 4

Y. Xu, N. Tamamaki, T. Noda, K. Kimura, Y. Itokazu, N. Matsumoto, M. Dezawa, and C. Ide. Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Experimental Neurology*, 192(2):251–264, Apr. 2005. 32

M. Yamaguchi and K. Mori. Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(27):9697–9702, July 2005. 42

Z. Yan, J. Tan, C. Qin, Y. Lu, C. Ding, and M. Luo. Precise circuitry links bilaterally symmetric olfactory maps. *Neuron*, 58(4):613–624, 2008. 26

P. Yang, X. Yin, and U. Rutishauser. Intercellular space is affected by the polysialic acid content of NCAM. *The Journal of Cell Biology*, 116(6):1487–1496, Mar. 1992. 37

S.-Y. Yau, B. W.-M. Lau, and K.-F. So. Adult hippocampal neurogenesis: a possible way how physical exercise counteracts stress. *Cell Transplantation*, 20(1):99–111, 2011. 46

N. Ying, J. Tian, S. Yu, J. Zhou, S. Ling, L. Xia, and X. Ye. Progress in defining heterogeneity and modeling periglomerular cells in the olfactory bulb. *Science China. Life Sciences*, 55 (7):567–575, July 2012. 24

R. Yirmiya and I. Goshen. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(2):181–213, Feb. 2011. 44

T. K. Yokoyama, D. Mochimaru, K. Murata, H. Manabe, K. Kobayakawa, R. Kobayakawa, H. Sakano, K. Mori, and M. Yamaguchi. Elimination of adult-born neurons in the olfactory bulb is promoted during the postprandial period. *Neuron*, 71(5):883–897, Sept. 2011. 42, 43

S. Yona, K.-W. Kim, Y. Wolf, A. Mildner, D. Varol, M. Breker, D. Strauss-Ayali, S. Viukov, M. Guilliams, A. Misharin, D. A. Hume, H. Perlman, B. Malissen, E. Zelzer, and S. Jung. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, 38(1):79–91, Jan. 2013. 4

M. Yoneyama and K. Ogita. Activation of neuronal regeneration signal following neuronal degeneration-involvement of microglia. *Nihon Yakurigaku Zasshi. Folia Pharmacologica Japonica*, 142(1):17–21, July 2013. 14

S.-i. Yoshihara, H. Takahashi, N. Nishimura, H. Naritsuka, T. Shirao, H. Hirai, Y. Yoshihara, K. Mori, P. L. Stern, and A. Tsuboi. 5t4 glycoprotein regulates the sensory input-dependent development of a specific subtype of newborn interneurons in the mouse olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(6): 2217–2226, Feb. 2012. 42

R. Yoshimura, H. Hori, A. Ikenouchi-Sugita, W. Umene-Nakano, N. Ueda, and J. Nakamura. Higher plasma interleukin-6 (IL-6) level is associated with SSRI- or SNRI-refractory depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(4):722–726, June 2009. 47

D. Young, P. A. Lawlor, P. Leone, M. Dragunow, and M. J. During. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nature Medicine*, 5(4):448–453, Apr. 1999. 45

T.-F. Yuan and O. Arias-Carrión. Adult neurogenesis in the hypothalamus: evidence, functions, and implications. *CNS & neurological disorders drug targets*, 10(4):433–439, June 2011. 32

N. Zampieri, T. M. Jessell, and A. J. Murray. Mapping sensory circuits by anterograde transsynaptic transfer of recombinant rabies virus. *Neuron*, 81(4):766–778, Feb. 2014. 12

X. Zhang, N. Surguladze, B. Slagle-Webb, A. Cozzi, and J. R. Connor. Cellular iron status influences the functional relationship between microglia and oligodendrocytes. *Glia*, 54(8): 795–804, Dec. 2006. 17

A. N. Ziegler, S. W. Levison, and T. L. Wood. Insulin and IGF receptor signalling in neural-stem-cell homeostasis. *Nature Reviews. Endocrinology*, 11(3):161–170, Mar. 2015. 35

Y. Ziv, N. Ron, O. Butovsky, G. Landa, E. Sudai, N. Greenberg, H. Cohen, J. Kipnis, and M. Schwartz. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nature neuroscience*, 9(2):268–275, 2006. 45

Résumé

La cellule microgliale, seule cellule du système immunitaire résidant en permanence dans le système nerveux central, a un rôle important dans le développement cérébral. Elle participe à l'élagage des neurones en développement, *via* le marquage des épines dendritiques à éliminer par les facteurs du complément.

Certaines régions cérébrales continuent à produire des neurones à l'âge adulte. Chez le rongeur, des néo-neurones sont ainsi générés dans la zone sous-ventriculaire tout au long de la vie et migrent vers le bulbe olfactif où ils s'intègrent au réseau pré-existant.

Le but de ce travail est de **caractériser l'implication de la microglie dans le développement et l'élagage des neurones nés dans le système olfactif de la souris à l'âge adulte**.

Pour ce faire, nous avons combiné des **méthodes d'étude du comportement, d'immunohistochimie, de microscopie confocale et d'analyse d'images** pour explorer les **interactions entre microglie et neurones bulbaires dans un contexte normal ou pathologique** : déafférentation olfactive, inflammation par les lipopolysaccharides (LPS) bactériens, dérégulation de l'axe hypothalamus-pituitaire-adrénal ou déficience génétique en complément C3 ($C3^{-/-}$).

Nous avons découvert que la microglie phagocyte préférentiellement les néo-neurones nés à l'âge adulte par rapport aux neurones néonataux, et que cette tendance s'accentue encore en cas de déafférentation sensorielle. Ainsi, la microglie façonne le réseau neuronal du bulbe en fonction des expériences sensorielles. La densité d'épines dendritiques est peu impactée par l'activation microgliale, et n'est pas modifiée par l'absence de complément C3. Cela suggère que **l'élagage des néo-neurones du bulbe olfactif pourrait ne pas mettre en jeu la microglie et le complément C3**.

En conclusion, ce travail de thèse montre l'**importance de la microglie dans la régulation du taux de neurogenèse bulbaire en fonction de l'activité sensorielle.** L'implication de la microglie dans les mécanismes de plasticité neuronale ouvre des perspectives de recherche pour des thérapies ciblées sur les cellules microgliales.

Mots clefs :

microglie, neurogenèse adulte, bulbe olfactif, arbre dendritique, épines dendritiques, olfaction, déafférentation, inflammation, dépression, plasticité, interneurones.