



HAL
open science

Le rôle des cellules microgliales dans le développement des circuits neuronaux

Charlotte Bertot

► **To cite this version:**

Charlotte Bertot. Le rôle des cellules microgliales dans le développement des circuits neuronaux. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0414 . tel-01583026

HAL Id: tel-01583026

<https://theses.hal.science/tel-01583026>

Submitted on 6 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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ NEUROSCIENCES

Par Charlotte BERTOT

**LE ROLE DES CELLULES MICROGLIALES DANS LE DEVELOPPEMENT DES
CIRCUITS NEURONAUX**

Sous la direction de : Elena AVIGNONE

Soutenue le 7 Décembre 2016

Membres du jury :

Daniel VOISIN, Professeur des Universités, Université de Bordeaux
Valérie CREPEL, Directeur de Recherche, Aix-Marseille Université
Etienne AUDINAT, Directeur de Recherche, Université Paris Descartes
Eric BOUE-GRABOT, Directeur de Recherche, Université de Bordeaux

Président
Rapporteur
Rapporteur
Invité

Résumé

Le rôle des cellules microgliales dans le développement des circuits neuronaux

Les cellules microgliales constituent la population de macrophages résidents du système nerveux central. De par leur appartenance au système immunitaire, elles furent longtemps considérées actives uniquement en conditions pathologiques. Au contraire, ces dernières décennies, elles sont apparues comme physiologiquement actives, notamment au cours de la période critique de formation du système nerveux central. Au cours du développement embryonnaire et postnatal, les neurones nouvellement générés migrent vers leur position définitive avant de développer leur arbre dendritique et axonal afin de former les connexions synaptiques à la base des réseaux nécessaires aux fonctions cérébrales. L'étude des microglies au cours de la période postnatale, a montré l'implication d'un mode de communication spécifique entre les neurones et la microglie, la voie Fractalkine/CX3CR1, dans la mise en place des cellules microgliales d'une part et dans le développement synaptique glutamatergique d'autre part. Cependant, l'importance de cette communication neurone-microglie pour le développement du système inhibiteur GABAergique est peu connue.

Au cours de mon travail de thèse, je me suis intéressée au rôle de la voie de communication Fractalkine/CX3CR1 dans la distribution des cellules microgliales et le développement postnatal du réseau GABAergique de l'Hippocampe. Nous avons ainsi montré que la suppression du récepteur microglial CX3CR1 induit une diminution du nombre de microglies dans la région CA3 de l'Hippocampe, dans une fenêtre temporelle précise entre 7 et 9 jours après la naissance. Cette diminution du nombre de microglies est corrélée avec une altération de l'activité de réseau au niveau de cette région. En effet, la fréquence des GDPs (Giant Depolarizing Potentials), une activité de réseau impliquée dans la formation et la maturation des synapses et spécifiquement générée en CA3, est diminuée à la fin de la première semaine postnatale. De plus, malgré l'absence de modification majeure de l'activité synaptique glutamatergique et GABAergique, les événements postsynaptiques GABAergiques présentent une sous-population d'évènements plus amples et des cinétiques légèrement plus rapides, pouvant suggérer une modification de la population d'interneurones mis en jeu.

L'ensemble de mon travail de thèse met en évidence l'impact de la communication neurone-microglie par la voie Fractalkine/CX3CR1 sur le développement postnatal de l'Hippocampe. Son absence affecte d'une part, la colonisation microgliale, et d'autre part, une activité de réseau caractéristique de l'Hippocampe, dans une fenêtre temporelle critique pour la mise en place des connexions synaptiques et la formation des réseaux neuronaux.

Mots clés : microglie, Hippocampe, développement postnatal, GDPs, réseau, GABA

The role of microglial cells in the development of neuronal circuits

Microglial cells, the resident macrophages of the central nervous system, were mainly studied for their role in pathological conditions, but they recently appeared to be involved in synaptic development and circuits formation during postnatal period. During this critical period, microglial cells colonize the central nervous system and interact with other cell types, including neurons. A specific way of communication between neurons and microglia involves neuronal released fractalkine (CX3CL1) and its specific microglial receptor CX3CR1. CX3CR1 KO mice contributed to unclosethe microglial role during development. Indeed, CX3CR1 ablation alters microglia distribution in the brain, and it affects glutamatergic transmission and synapse maturation. However, these effects seem to be transient and brain region specific and their mechanisms are poorly understood.

Furthermore, some effects observed in juvenile or adult mice may have origin during development, when neuronal connections are established. GABA plays a fundamental role in this process since it is excitatory. The influence of neuron-microglia interaction on neuronal activity in the hippocampus during this period is poorly understood. In particular, nothing is known on GABAergic activity, known to be synaptogenic during this period.

My PhD project aimed at investigating how the signaling fractalkine pathway impacts microglial colonization of the hippocampus and neuronal activity during the first two postnatal weeks. Our results indicate that in CX3CR1KO mice there is a reduction in the density of microglial cells at P7-P9 in the CA3 hippocampal area, accompanied at P7 by a significant reduction of frequency of Giant Depolarizing Potentials (GDPs), a network activity involved in hippocampal synapse formation and maturation. Furthermore, despite no overall difference in glutamatergic or GABAergic synaptic activity, GABAergic events display a subpopulation of larger events, and the kinetics was slightly faster.

Thus, the disruption of the specific neuronal-microglia signaling pathway on one hand impacts the microglia colonization of the hippocampus and on the other hands affects specifically neuronal network activity during a time window critical for the establishment of neuronal connections.

Keywords: microglia, Hippocampus, postnatal development, GDPs, network, GABA

Unité de recherche

CNRS UMR 5297 – Institut Interdisciplinaire de Neurosciences

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer ces trois années de travail et de mettre un point final à cette aventure. Je remercie Daniel Voisin, qui après avoir été mon professeur en Master et chanté la Marseillaise avec moi dans les bars de Copenhague, a accepté de présider mon jury lors de ma soutenance. Je remercie également Valérie Crépel et Etienne Audinat pour avoir accepté de poser leur regard d'experts sur mes recherches et d'en être les rapporteurs auprès de l'Université, ce malgré les délais raccourcis que je leur ai imposés. Enfin, je remercie Éric Boue-Grabot pour avoir accepté mon invitation et m'honorer de sa présence lors de ma soutenance.

Plus que tout autre personne, je remercie ma directrice de thèse Elena. Il est difficile de dire en seulement quelques lignes tout ce qu'il y aurait à dire sur sa relation avec son encadrant. Tous les étudiants en thèse seront d'accord avec moi pour dire qu'il s'agit de l'une des relations les plus complexes que l'on puisse avoir. A la frontière entre le patron et le parent spirituel, Elena a surtout eu pour moi le visage du mentor, toujours désireuse de me transmettre son savoir et son expérience, que cela soit scientifiquement ou humainement. Elle m'a appris à ne pas rester bloquée face à un problème, mais à réfléchir et à trouver des solutions. Elle m'a aussi transmis l'importance de se remettre en question lorsque c'était nécessaire, à accepter la critique pour s'améliorer et à toujours donner le meilleur de soi. Elle m'a également poussé à croire en moi, en mes capacités et à ne pas construire mes propres barrières. J'ai entendu ton message, mais on sera d'accord pour dire qu'il me reste du travail sur ce dernier point. Mais elle, elle a cru en moi, à un moment où je n'étais plus sûre de la direction à prendre, elle a vu quelque chose et m'a embarquée avec elle dans l'aventure de la thèse. Je la remercie de m'avoir accordé autant de temps, et je dois aussi remercier Hervé d'avoir bien voulu partager. Enfin, je retiendrai que chaque petite victoire, chaque petit accomplissement se doit d'être célébré autour d'une bière !

Je remercie Laurent pour m'avoir accueilli dans son équipe et avoir financé mon projet pendant ces trois années. Je le remercie également pour nos discussions et nos réflexions sur mes capricieux résultats. Je le remercie de chercher à instaurer les meilleures conditions de travail possible au sein du laboratoire. J'ai apprécié les Lab Meetings hebdomadaires qui nous permettent à tous de présenter notre travail dans un cadre informel et d'entendre de nouveaux points de vue sur nos résultats. J'ai adoré nos repas de Noël à thème, nos sorties au restaurant et nos journées labo, lorsque nous étions trempés en canoë, perchés dans les arbres ou tout simplement étalés sur la plage. Je le remercie également avec beaucoup, beaucoup, de reconnaissance de m'avoir offert la chance de partir en conférence au Japon ! C'est l'un des plus beaux voyages que j'ai eu la chance de vivre, et surtout l'endroit le plus éloigné de la maison que j'ai pu découvrir. J'ai énormément apprécié nos discussions et te découvrir sous une lumière différente de celle du labo. J'ai hâte que découvrir les livres dont nous seront les auteurs et de te dire « ça y est, j'ai réussi, j'ai un château ».

Bien sûr, je remercie chaleureusement tous les membres de l'équipe. Je remercie Delphine, notre maman charismatique toujours disponible. Merci à François, pour son humour cynique parfaitement assumé, et à Hélène pour son extrême gentillesse et sa façon inimitable de chercher ses clefs... Merci à Julien, le grand sportif, postdoc à mon arrivée, chercheur à mon départ, il m'a été d'une grande aide pour maîtriser les arcanes complexes et au combien mystérieuses de l'électrophy.

Je remercie également les postdocs girls pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur bonne humeur ! Merci à Emily qui m'a formée au comportement en A1 et nous a fait chanter suédois en buvant du snaps dans un tout autre contexte ; merci à Joana qui nous a nourri de spécialités portugaises et de quiproquos hilarants ; enfin merci à Silvia, avec qui j'ai partagé de superbes moments de Bordeaux à Copenhague.

Je remercie l'équipe de choc des thésardes de l'équipe. Merci à Julie, pour avoir été à mes yeux, et sans doute malgré elle, la thésarde par excellence, avec ses compétences scientifiques, son implication dans la vie étudiante, sa bonne humeur et son caractère bien trempé de bretonne. Merci et félicitations à Blanka, que j'admire pour savoir concilier tous ses projets. Bon courage à Pauline et Alexandra, pour l'aventure qui les attend.

Et bien sûr, un merci tout particulier à Laetitia, ma copine de thèse, sans qui je n'en serai peut-être pas là aujourd'hui. Merci d'avoir été la première personne avec qui j'ai parlé en Master 1, et d'être près de cinq ans plus tard l'une de mes amies les plus proches. Je te remercie de tout cœur d'avoir partagé avec moi les mêmes petites joies après une manip qui a marché, les mêmes déceptions, les mêmes colères, les mêmes doutes pour l'avenir qui nous attend mais aussi les mêmes espoirs. Merci de m'avoir permis de ne pas me sentir comme le mouton noir de la bergerie, mais de m'avoir fait réaliser que nous étions tous d'adorables petits moutons gris pleins de doutes et d'envies. Merci de m'avoir fait confiance pour t'apprendre à skier. Je te souhaite toute la réussite et le bonheur que tu mérites, et je te donne rendez-vous dans un an pour te rembourser la bière et la poutine !

Je remercie Pauline, ou « Paulinette » pour les intimes, pour sa joie de vivre et pour nous avoir permis d'écraser l'équipe adverse au laser-game. Merci à Marilyn, pour son humour décapant, ses anecdotes pas tout public et son relativisme.

Je remercie également ceux qui ont depuis quitté le labo : Aurélia, Ciaran, Laurent, merci pour les verres à Copenhague, Agnès, merci pour ta vision si rafraichissante des choses, Juan merci pour ta générosité et tes chansons au coin du feu. Merci aux stagiaires qui ont travaillé avec Elena et moi : Eléna, Laura et Ana. Et à tous les autres. Et bienvenue et bonne aventure aux nouveaux arrivants : Sébastien, Marion, ...

De façon plus générale je remercie les membres de l'Institut Interdisciplinaire de Neurosciences de Bordeaux (IINS) et son directeur Daniel Choquet, pour l'excellence de la Recherche qui y est accomplie, pour les moyens mis à la disposition des doctorants et pour l'environnement dans son ensemble. Je remercie les membres du BIC (Bordeaux Imaging Center) : Christel Poujol, Fabrice Cordelières, Sébastien Marais et Patrice Mascalchi, pour leur expertise, leur disponibilité, leur gentillesse et les fabuleuses images que j'ai pu acquérir grâce à eux pendant ces trois années. Je remercie les membres de l'animalerie spécialisée qui ont pris soin de mes souris pendant tout ce temps : Pierre Costet, Eléna Morillon et Thien-Anh Vernoy, merci pour les réunions et merci d'avoir toujours su répondre à nos demandes.

Je remercie également Anne-Karine Bouzior-Sore et Pascal Branchereau pour avoir fait partie de mon comité de mi-thèse et m'avoir ainsi permis de faire le point sur mes données et mes hypothèses à mi-parcours. Je remercie tout particulièrement Pascal pour m'avoir fait bénéficier de son expérience des pompes KCC2 et NKCC1 et m'avoir généreusement fourni son anticorps pour explorer l'une de nos prometteuses hypothèses. Je le remercie également pour sa gentillesse et nos discussions sur le monde de la Recherche et son fonctionnement.

Je tiens aussi à remercier Gwendal Le Masson et l'ensemble de son équipe qui m'ont accueilli en master 1 puis en master 2 et m'ont donné l'envie et la motivation de poursuivre ma formation en doctorat : Jean-

Marie Cabelguen, Claire, Virginie, Vanessa, Fanny, Alexia et Stéphanie. Je remercie tout particulièrement Ludivine, pour m'avoir aidé pendant sa propre thèse et avoir répondu à mes questions.

Je remercie les membres du bureau de l'association des doctorants en biologie de Bordeaux : Charline, Anaïs, Charlotte, Chloé, Julie et Loïc (ne te sauves pas, je reviens à toi un peu plus loin). Merci d'avoir cru au même projet que moi et d'avoir initié tant de choses. Je remercie d'ailleurs tous les doctorants avec qui j'ai pu passer du temps ces dernières années : Mathieu, Thomas, Mirelle, Amine, Ben, Simon et tant d'autres, je suis désolée de ne pas chercher à tous les citer, j'aurais trop peur d'en oublier. Merci à tous de faire de la thèse ce qu'elle est, une aventure !

La thèse est un projet personnel, mais peu de gens pourrait aller au bout sans le soutien de leurs proches. J'en viens donc à remercier ma famille. Evidemment, ils ne m'ont pas aidé à sacrifier mes souris ou à enregistrer mes neurones, mais sans leur soutien indéfectible je ne serai certainement pas là aujourd'hui. Je remercie mes parents, d'avoir toujours cru en moi, bien plus que je ne crois en moi-même. Merci de m'avoir accompagné et soutenu toutes ces années, depuis mon départ précipité pour l'armée juste après le bac jusqu'à aujourd'hui, en passant par ma Licence en biologie, suivie du Master et finalement de ces trois années de thèse. J'espère vous avoir rendu fier et surtout continuer à le faire. Je remercie également mes trois frères Johnny, Michaël et Guillaume, et mes bien nommées belles-sœurs Laurence, Perrine et Karyn pour leur soutien. Je remercie aussi mes très chers neveux et nièces Alexie, Tristan, Charlie et Amaury. Vous pourrez dorénavant vous vanter d'avoir un docteur dans la famille. Je remercie également ma belle-famille, pour m'avoir accueilli parmi eux et avoir su faire avec nos emplois du temps compliqués. Je remercie également Xénia, qui a été l'équivalent d'une sœur pendant de nombreuses années et que j'espère avoir dorénavant le temps de retrouver.

Enfin, je remercie Loïc, qui traverse toutes ces épreuves avec moi depuis maintenant presque neuf ans. Je le remercie de partager mes projets, mes joies, mes doutes, mes peines et mes espoirs, de rire avec moi quand tout va bien et de me consoler et me remettre d'aplomb quand je suis à terre. Jamais je n'aurais réussi sans toi et je suis impatiente d'écrire le prochain chapitre de nos aventures.

Table des matières

Résumé	1
Remerciements	3
PARTIE 1 – INTRODUCTION	8
Avant-propos.....	9
Chapitre 1 – Le développement du réseau de l’Hippocampe.....	11
I. Qu’est-ce que l’Hippocampe ?	11
a. Description anatomique	11
b. Cytoarchitecture	12
c. Les neurones pyramidaux localisés en CA3	13
d. Les interneurons GABAergiques contactant CA3	16
e. Connectivité de l’Hippocampe	18
f. Rôle dans la mémorisation et la représentation spatiale	21
g. Pathologies et altérations développementales.....	23
II. Développement de l’Hippocampe	24
a. Neurogenèse hippocampique	24
<i>Les neurones pyramidaux glutamatergiques</i>	<i>24</i>
<i>Les interneurons GABAergiques</i>	<i>25</i>
b. Développement morphologique et connectivité des neurones pyramidaux.....	26
c. Développement des propriétés électrophysiologiques	28
d. SPAs et GDPs, des activités de réseau développementales	30
Chapitre 2 – Les cellules microgliales.....	33
I. Qu’est-ce que la microglie ?.....	33
a. Historique et découverte.....	33
b. L’activation microgliale.....	35
<i>La signalisation « ON/OFF »</i>	<i>35</i>
<i>Changement de morphologie et recrutement</i>	<i>37</i>
<i>Changement du profil électrophysiologique.....</i>	<i>38</i>
<i>Changement du profil d’expression génique et marqueurs d’activation</i>	<i>39</i>
c. Les principales fonctions de la microglie « activée » en conditions pathologiques.....	40
<i>Phagocytose</i>	<i>40</i>
<i>Le « stripping » de synapses</i>	<i>41</i>
<i>Libération de facteurs : de la neurotoxicité à la neuroprotection</i>	<i>41</i>

<i>Modulation de l'activité synaptique</i>	42
d. La microglie « au repos » en condition physiologique ?	43
<i>Motilité et surveillance active</i>	43
<i>Motilité modulée par les neurones</i>	44
<i>Modulation de l'activité synaptique</i>	45
<i>Neurogenèse adulte</i>	46
e. La distribution des cellules microgliales	47
II. La microglie au cours du développement	48
a. L'origine extraembryonnaire des microglies	48
b. La colonisation du système nerveux central par les cellules microgliales	49
c. Les fonctions de la microglie au cours du développement	53
<i>Phagocytose et apoptose</i>	54
<i>Neurogenèse et survie neuronale</i>	55
<i>Développement axonal</i>	55
<i>Synaptogenèse et remodelage synaptique</i>	56
<i>Maturation synaptique</i>	57
<i>Développement des neurones GABAergiques</i>	58
III. Le rôle particulier de la Fractalkine	59
PARTIE 2 – PROJET DE THESE	63
Chapitre 1 : Objectifs.....	64
Chapitre 2 : Plan expérimental et résultats principaux.....	66
PARTIE 3 – RESULTATS	69
Chapitre 1 : Mise en place technique et résultats préliminaires	70
Chapitre 2 : Publication	84
PARTIE 4 - DISCUSSION	114
Références	124

PARTIE 1 – INTRODUCTION

Avant-propos

Le développement du système nerveux central est une période critique définie par une succession organisée d'évènements dont le bon déroulement augure de la mise en place de réseaux neuronaux cohérents, nécessaires au fonctionnement basique du corps humain comme à l'élaboration de processus cognitifs complexes. La perturbation de cette mise en place peut induire l'apparition de symptômes cognitifs et le développement de désordres neuropsychiatriques tels que la schizophrénie ou l'autisme. Le développement cérébral met en jeu différents acteurs cellulaires, notamment certaines cellules du système immunitaire : les microglies.

Le projet de cette thèse visant à étudier le rôle des cellules microgliales dans le développement des connexions neuronales d'une région particulière du cerveau, l'Hippocampe, l'introduction de ce manuscrit vise à apporter les informations nécessaires à la compréhension et à la discussion des résultats obtenus.

Dans le premier chapitre, nous nous intéresserons au réseau de l'Hippocampe. Nous verrons dans un premier temps sa construction générale d'un point de vue anatomique en décrivant la structure en elle-même. Seront ensuite présentées les connexions neuronales intrinsèques entre les différentes sous-régions de l'Hippocampe, et extrinsèques entre l'Hippocampe et l'autres régions cérébrales. Nous aborderons ensuite certaines de ses fonctions physiologiques les plus importantes et son implication dans le développement de désordres neuropsychiatriques, notamment la schizophrénie et l'autisme. Nous verrons ensuite le développement de l'Hippocampe, depuis la formation de la structure et la génération des neurones qui la composent, jusqu'à la mise en place de leurs connexions et l'apparition des premières activités de réseaux, parmi lesquelles les Giants Depolarizing Potentials (GDPs).

Dans le second chapitre, nous aborderons la description de la microglie. Nous verrons d'abord l'histoire de sa découverte par Pio del Rio-Hortega, ainsi que ses caractéristiques générales. Nous nous intéresserons ensuite plus particulièrement à son comportement d'« activation » en condition pathologique, initialement considéré comme son unique rôle dans le système nerveux central. Seront ensuite présentés les différents rôles qu'elle remplit dans ces conditions pathologiques mais également physiologiques, où nous verrons qu'elle n'est finalement pas inactive, puisqu'elle explore continuellement son environnement et participe à l'activité synaptique et à la neurogenèse adulte.

Enfin, nous aborderons la période qui nous intéresse dans ce projet, le développement. La microglie, qui colonise alors le système nerveux central alors en formation depuis la périphérie dont elle est issue, est impliquées dans de nombreuses étapes du développement neuronal. Outre son rôle principal dans la

phagocytose, c'est-à-dire l'élimination, des débris neuronaux, la microglie participe également à la neurogenèse et au développement synaptique.

Nous terminerons cette introduction par la description d'une voie de communication particulière entre les neurones et la microglie : la voie de signalisation Fractalkine/CX3CR1. Nous verrons que cette communication est particulièrement importante au cours du développement mais qu'elle peut également induire l'apparition de troubles cognitifs et comportements chez l'adulte en cas d'absence.

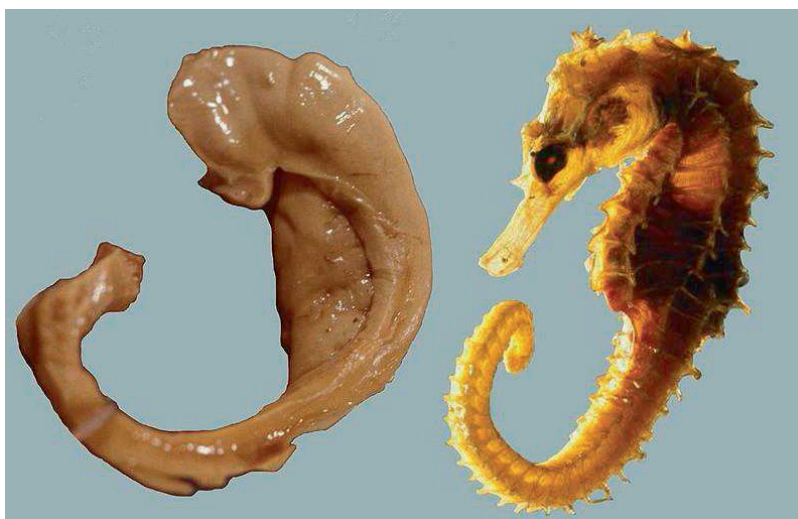
Chapitre 1 – Le développement du réseau de l'Hippocampe

I. Qu'est-ce que l'Hippocampe ?

Le cerveau de l'Homme, et des vertébrés en générale, est constitué de différentes régions, chacune composée de neurones connectés entre eux d'une façon spécifique. Ainsi, chaque région correspond à un circuit fonctionnel à la base d'une ou plusieurs fonctions cognitives qui lui sont propres. Parmi ces régions, l'Hippocampe remplit un rôle majeur dans les fonctions d'apprentissage, de mémorisation à court terme et à long terme ou encore de reconnaissance spatiale.

a. Description anatomique

L'Hippocampe tient son nom de sa forme générale similaire à celle de l'animal marin. Elle est ainsi décrite dès 1587 par Julius Caesar Arantius (Giulio Cesare Aranzi) dans le premier chapitre de son livre *Humano Foetu Liber* (Bir et al., 2015). Elle a également été apparentée à une corne de bélier et nommée corne d'Ammon d'après l'ancien dieu égyptien. Le terme latin « cornu ammonis » a été introduit par le neuroanatomiste Rafael Lorente de Nó en 1934 (Schultz and Engelhardt, 2014).



Photographie comparant la forme générale de l'Hippocampe humain et de l'animal marin du même nom. L'Hippocampe en lui-même correspondrait à la tête, alors que la fimbria et le fornix correspondraient au corps et à la queue de l'animal. Photographie libre de droit du Professeur László Seress.

L'Hippocampe est une structure de la cinquième circonvolution temporale. Bilatéral et symétrique, l'Hippocampe est situé au niveau de la face médiale du lobe temporal et forme la paroi médiale du ventricule latéral. Au sein de cette circonvolution, l'Hippocampe est relié au gyrus parahippocampique par le subiculum

et le cortex entorhinal. D'autre part, il est rattaché au reste du système limbique (Amygdales, Septum, Thalamus) dont il fait partie par la fimbria de l'Hippocampe formant le fornix, une structure fibreuse qui se termine au niveau des corps mammillaires. Les hippocampes de chaque hémisphère sont reliés entre eux par la commissure hippocampique du corps calleux localisée dans le fornix.

Avec le Gyrus Denté, le complexe subiculaire (subiculum proprium, presubiculum, parasubiculum) et le cortex entorhinal, l'Hippocampe (Corne d'Ammon) constitue la formation hippocampique.

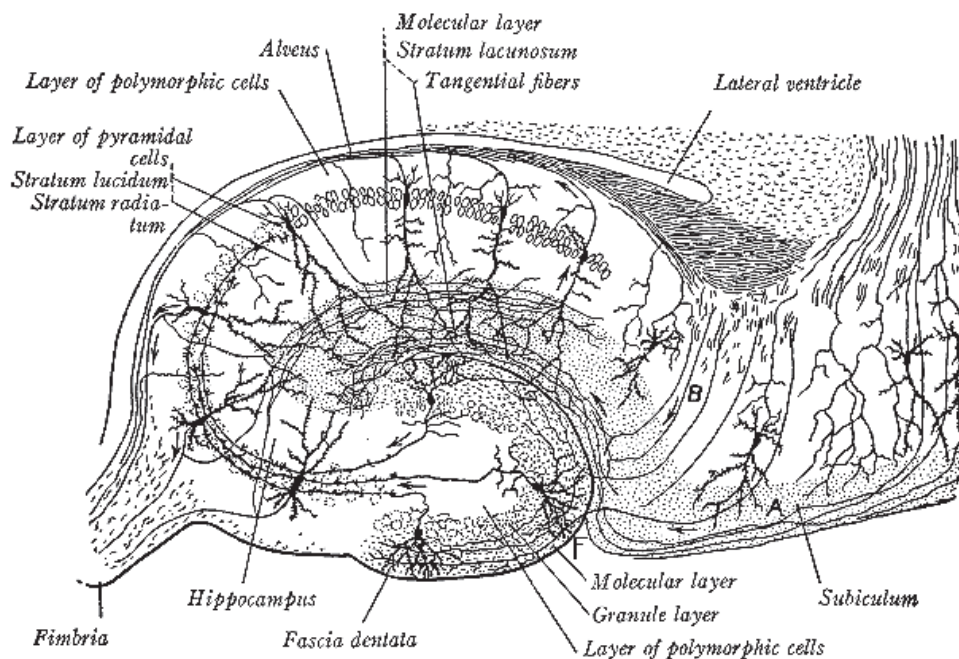
b. Cytoarchitecture

La cytoarchitecture interne de l'Hippocampe peut être décrite plus en détail sur une vue transversale de la structure. A partir d'un marquage nucléaire au DAPI, on peut observer la présence de deux structures en C imbriquées l'une dans l'autre. Il s'agit de la corne d'Ammon (l'Hippocampe per se) et du Gyrus denté.

Chacune de ces régions est constituée de plusieurs couches, ou sous-régions, identifiables selon sa composition cellulaire ou fibreuse (Lorente de Nó, 1934 ; Schultz and Engelhardt, 2014).

Le Gyrus denté est une structure en trois couches, séparée de la corne d'Ammon et du subiculum par la fissure hippocampique. Sa couche principale est constituée des somas des cellules granulaires, assemblés de façon compacte. Ces neurones développent leurs dendrites apicales pourvues d'épines dans la couche moléculaire, la plus externe du Gyrus denté. La partie interne du Gyrus denté correspond à la couche polymorphique ou Hilus, formé des segments initiaux des axones des neurones granulaires donnant naissance aux fibres moussues envoyées vers la corne d'Ammon. Les somas de neurones présents au niveau du Hilus ne sont pas différenciables des neurones de la corne d'Ammon et sont le plus souvent considérés comme faisant partie de l'aire CA3 de l'Hippocampe.

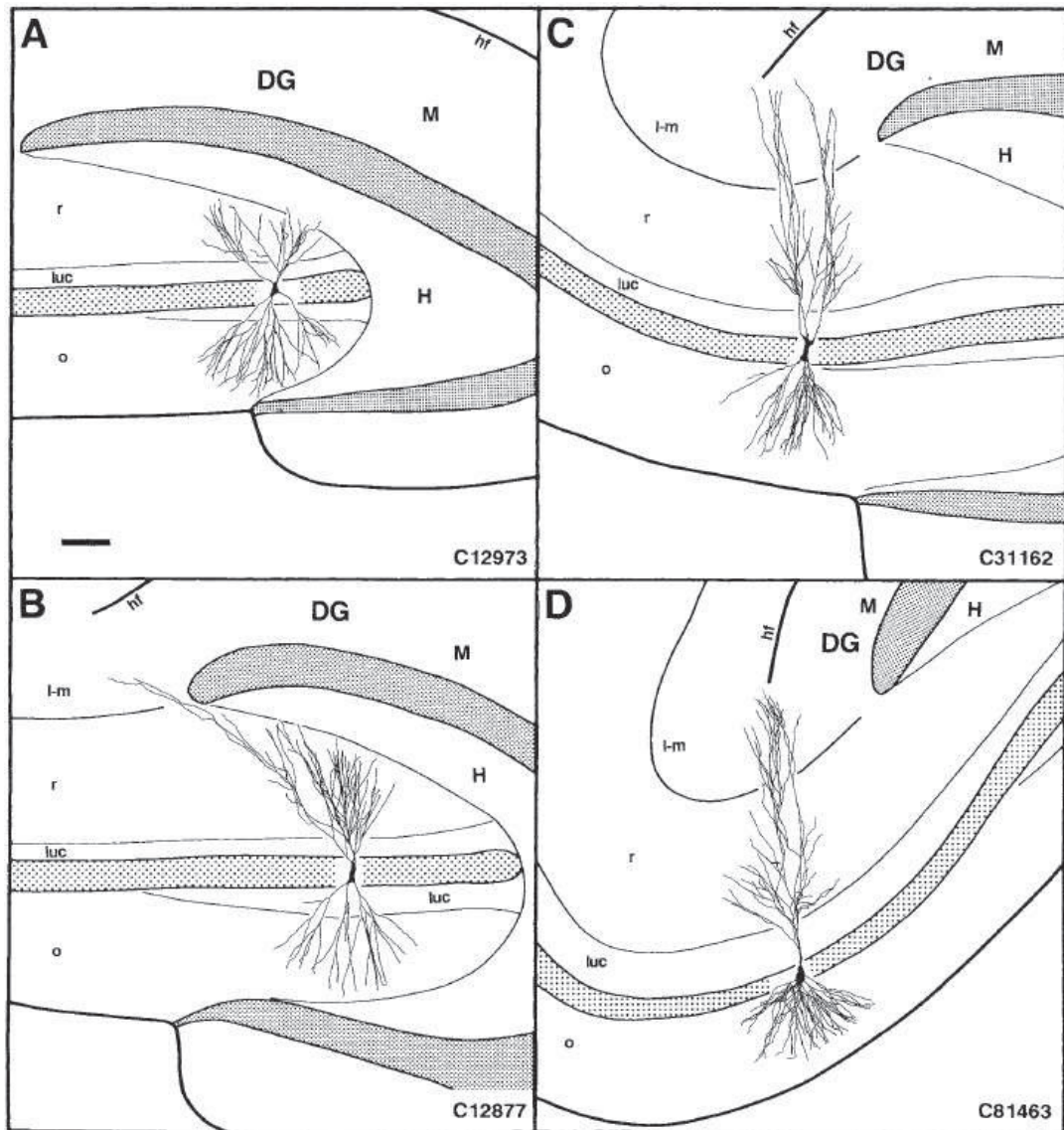
En effet, la corne d'Ammon est communément divisée en trois parties : CA1, CA2 et CA3. Comme décrit ci-dessus, CA3 correspond à la partie la plus proche du Gyrus denté. Elle se prolonge par CA2 puis CA1 jusqu'au Subiculum. La corne d'Ammon est construite en cinq couches. La couche principale, le stratum pyramidal, contient les somas des neurones pyramidaux, excitateurs et glutamatergiques. Cette couche très étroite et dense chez les espèces moins développées, s'épaissit et se disperse chez les primates et chez l'Homme (Stephan, 1983). Les limites de cette couche sont difficiles à établir entre CA3, CA2, CA1 et le subiculum qui se distinguent principalement par leur connectivité respective. Les neurones pyramidaux projettent leurs axones en direction de la fimbria ou du subiculum, formant ainsi l'Alvéus, la paroi délimitant la lumière du ventricule. Leurs dendrites basales s'étendent quant à elles dans le stratum oriens et leurs dendrites apicales dans les strata radiatum et lacunosum-moleculare. En CA3, une sous-région supplémentaire est reconnue, le stratum lucidum, intercalé entre la couche pyramidale et le stratum radiatum il reçoit les fibres moussues issues du Gyrus Denté.



Dessin de Ramon y Cajal représentant la structure et les connexions de l'Hippocampe.

c. Les neurones pyramidaux localisés en CA3

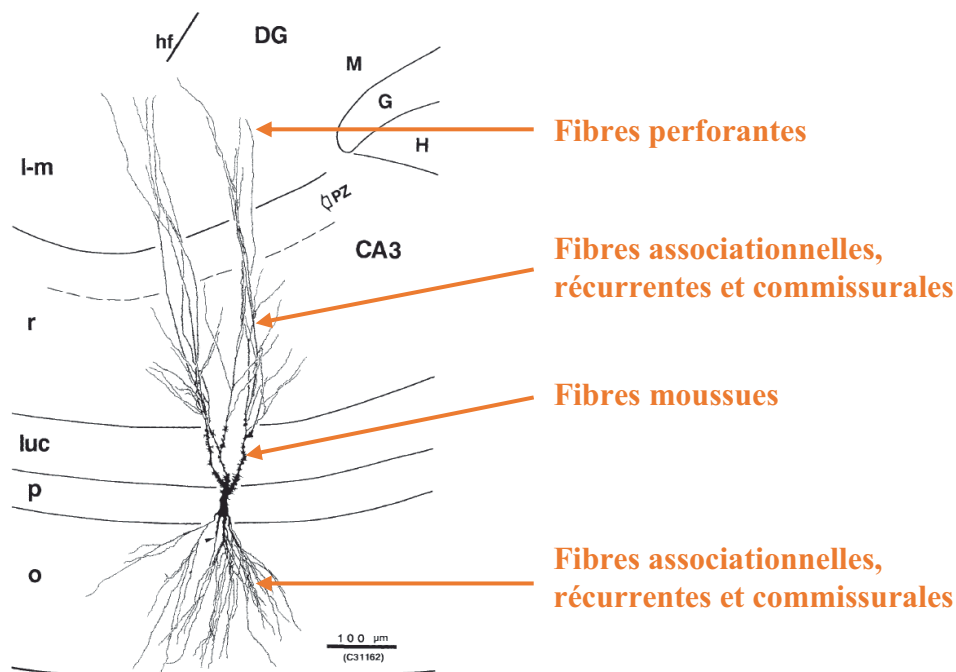
Les neurones pyramidaux de l'Hippocampe présentent une morphologie générale relativement stéréotypée, avec un soma triangulaire localisé au niveau de la couche pyramidale et une structure dendritique très développée (Ishizuka et al., 1995). En CA3 par exemple, les dendrites basales sont des dendrites dites primaires constituées de 2 à 7 branches directement issues du soma. Les dendrites apicales sont quant à elles plus complexes, formées d'une à trois dendrites primaires d'où partent plus de quatre dendrites secondaires épaisses. Ces dendrites donnent à leur tour des embranchements latéraux plus fins. La morphologie de ces neurones apparaît fortement dépendante de leur localisation selon l'axe proximodistal. Ainsi, les neurones les plus proximaux, c'est-à-dire les plus proches du gyrus denté, présentent un soma de petite taille associé à une arborisation moins développée. Plus l'on se rapproche de CA1, plus cette dynamique s'inverse avec un soma plus large et des dendrites plus longs.



Dessins générés numériquement représentant la morphologie des neurones pyramidaux de CA3 selon leur position proximale (A) ou distale (D). Illustrations issues de Ishizuka et al., 1995. La barre d'échelle correspond à 100 μm .

Nous avons pris soin, au long de cette thèse de maintenir notre étude de l'activité neuronale dans une zone de CA3 relativement restreinte et contrôlée, afin d'éviter la variabilité morphologique pouvant impliquer différentes sous-populations de neurones pyramidaux et surtout différentes afférences et donc une variabilité de l'activité neuronale postsynaptique. En effet, les dendrites basales et apicales, respectivement situées en oriens et en radiatum, permettent au neurone pyramidal de recevoir l'information de différentes origines. Ces afférences sont en quelque sorte ségréguées, dans la mesure où une portion des dendrites leur est spécifiquement allouée. Ainsi, les neurones pyramidaux de CA3 vont spécifiquement recevoir les fibres glutamatergiques moussues, issues des neurones granulaires du gyrus denté, au niveau du stratum lucidum. Dans cette portion de la dendrite apicale, sont localisées des excroissances épineuses (en anglais thorny excrescences) où convergent plusieurs fibres (Chicurel and Harris,

1992; Gonzales et al., 2001). Les neurones de CA3 reçoivent d'autres afférences glutamatergiques, les fibres perforantes issues du cortex entorhinal au niveau le plus distal des dendrites apicales, dans le stratum lacunosum/moleculare (Witter and Amaral, 1991). L'une des particularités du réseau local en CA3 provient de la récurrence des connexions puisque les neurones pyramidaux sont très interconnectés. Ils reçoivent en effet tout le long de leurs dendrites en oriens et en radiatum, des fibres d'autres neurones de CA3 du même hippocampe ipsilatéral (fibres associationnelles ou récurrentes) ou de l'hippocampe controlatéral via la commissure hippocampique et la fimbria (Swanson et al., 1980 ; Ishizuka et al., 1990).



Principales afférences glutamatergiques des neurones pyramidaux de CA3. Figure modifiée à partir de Ishizuka et al., 1995.

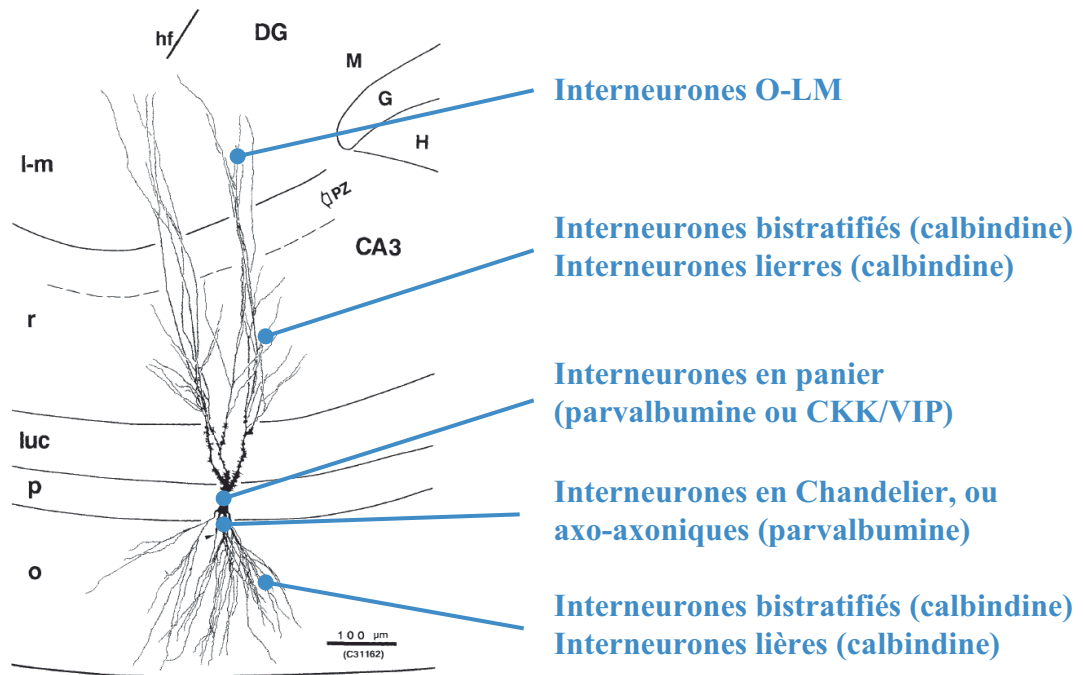
Le glutamate libéré au niveau de la synapse a pour effet d'activer deux types de récepteurs : les récepteurs ionotropiques (NMDA, AMPA et Kainate) et les récepteurs métabotropiques ("The Hippocampus Book" publié par Per Andersen). Les récepteurs ionotropiques sont des canaux ioniques, induisant lorsqu'ils sont activés par le glutamate la dépolarisation de la membrane, rapprochant son potentiel du seuil de potentiels d'action. Les récepteurs AMPA et NMDA constituent ainsi les principaux acteurs de l'activation postsynaptique, alors que les récepteurs kainate et métabotropiques assurent la modulation. Les récepteurs NMDA et AMPA sont des hétéro-tétramères constitués de différentes sous-unités. Les récepteurs NMDA sont le plus souvent constitués de deux sous-unités NR1 (ou GluN1) et de deux sous-unités NR2 (ou GluN2), dont il existe quatre types : NR2A (la plus répandue), B, C et D (Monyer et al., 1994). Les récepteurs AMPA sont quant à eux composés des sous-unités gluR1, 2, 3 et 4 dont l'association gluR1/2 est la plus courante (Petralia and Wenthold, 1992).

Les neurones pyramidaux de CA3 présentent également de nombreuses synapses GABAergiques inhibitrices. Ces connexions peuvent être périssomatiques ou dendritiques, selon le type d'interneurone mis en jeu (Freund and Buzsáki, 1996; Danglot et al., 2006).

d. Les interneurons GABAergiques contactant CA3

En effet, l'Hippocampe est constitué de différentes populations d'interneurones GABAergiques caractérisés par leur projections et leur expression spécifique de marqueurs biochimiques (Freund and Buzsáki, 1996; Danglot et al., 2006). Ainsi, parmi les interneurons à innervation périssomatique, les cellules en panier (basket cells) forment leurs synapses directement sur le soma ou au niveau proximal des dendrites alors que les cellules en Chandelier, ou axo-axoniques, contactent comme leur nom l'indique le segment initial des axones des neurones pyramidaux (Somogyi et al., 1983 ; Kosaka et al., 1987 ; Freund and Buzsáki, 1996). Parmi les interneurons à connexion dendritique, certains ciblent l'ensemble de l'arbre dendritique comme les neurones bistratifiés (bistratified cells, (Buhl et al., 1994)) ou les cellules lierre (ivy cells, (Fuentesalba et al., 2008)). D'autres sont beaucoup plus spécifiques et projettent seulement au niveau du stratum lacunosum-moleculare comme les cellules neurogliaformes ou les cellules O-LM (Khazipov et al., 1995 ; Tamás et al., 2003 ; Vida et al., 1998). Ces dernières, nommées O-LM pour Oriens-Lacunusum-Moleculare ont la particularité d'avoir leur corps cellulaire au niveau du stratum oriens mais de projeter uniquement leurs axones dans le stratum lacunosum-moleculare. En ciblant ainsi différentes portions des neurones pyramidaux, ces cellules inhibitrices vont pouvoir agir en amont ou en aval de l'intégration du signal c'est-à-dire influencer les afférences pour les interneurons dendritiques ou les efférences pour les neurones périssomatiques.

En plus d'être différenciables de par leurs projections axonales, les interneurons peuvent également être classés selon l'expression de marqueur biochimiques (Freund and Buzsáki, 1996). Les cellules en Chandelier et la majorité des neurones en panier expriment par exemple la protéine Parvalbumine (PV (Kosaka et al., 1987)). Le reste des cellules en panier se caractérisent quant à elles par l'expression des neuropeptides cholecystokinine (CKK) et VIP (pour vasoactive intestinal polypeptide), et du récepteur aux cannabinoïdes CB1 (Katona et al., 1999). Les interneurons dendritiques expriment une protéine chélatrice du calcium spécifique, la calbindine (CB) ainsi que l'enzyme de synthèse de l'oxyde nitrique neuronal (Gulyás and Freund, 1996; Seress et al., 2005). Enfin, les cellules O-LM se caractérisent par l'expression du neuropeptide somatostatine (SOM (Freund and Buzsáki, 1996)).



Principales afférences GABAergiques des neurones pyramidaux de CA3. Figure modifiée à partir de Ishizuka et al., 1995.

On peut noter qu'une dernière population de neurones GABAergiques, projetant spécifiquement sur les autres interneurons et non sur les cellules pyramidales, est caractérisée par l'expression des protéines calretinine et/ou VIP, ce sont les interneurons IS (Interneuron-Selective (Acsády et al., 1996a, 1996b; Gulyás et al., 1996; Hajos et al., 1996)). Ils ne sont cependant pas les seuls interneurons à contacter d'autres neurones GABAergiques puisque les cellules en panier sont interconnectées entre elles par des synapses chimiques et électriques (jonctions GAP (Fukuda and Kosaka, 2000)). Enfin, les interneurons sont capables de projeter leurs axones sur des régions plus distantes, par exemple certains interneurons localisés dans le stratum oriens et au niveau de l'Hilus contactent d'autres interneurons en dehors de l'Hippocampe au niveau du septum (Alonso and Köhler, 1982). Ces interneurons correspondent aux cellules HIPP, exprimant la somatostatine (Jinno et al., 2007a; Villette et al., 2016).

Dans l'Hippocampe, il existe deux types de récepteurs membranaires activés par le neurotransmetteur inhibiteur GABA libéré par les interneurons : les récepteurs ionotropiques de type A ($GABA_A$) et les récepteurs métabotropiques de type B ($GABA_B$).

Les récepteurs $GABA_B$ sont des protéines à sept domaines transmembranaires, le plus souvent sous forme d'hétérodimère R1/R2. Couplés à des protéines G, ils induisent l'ouverture de canaux potassiques K^+ et donc une hyperpolarisation membranaire retardée (200 ms) mais durable (450-2000 ms (Bettler et al., 2004)). En raison de leurs faibles efficacité et affinité pour le neurotransmetteur, les récepteurs $GABA_B$ ne sont pas activés par la libération unitaire de GABA par les interneurons, contrairement aux récepteurs $GABA_A$ ("The Hippocampus Book" publié par Per Andersen).

Les récepteurs $GABA_A$ sont des canaux perméables aux anions, particulièrement à l'ion Cl^- . Dans une cellule mature à son potentiel de repos, l'activation du récepteur induit une entrée de l'ion Cl^- qui hyperpolarise alors la membrane et l'empêche d'atteindre son seuil de potentiel d'action ("The Hippocampus Book" publié par Per Andersen). Les récepteurs $GABA_A$ sont formés d'un pentamère de sous-unités dont $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 2$ et δ sont significativement exprimés au niveau de l'Hippocampe. Ces sous-unités sont uniformément distribuées sur l'arbre dendritique des neurones pyramidaux et plus clairsemées au niveau du soma (Sperk et al., 1997). Il a été suggéré que la sous-unité α déterminerait les cinétiques d'activation des récepteurs, c'est-à-dire la vitesse à laquelle le canal s'ouvre pour laisser passer les ions Cl^- (Goldstein et al., 2002). Ainsi la sous-unité $\alpha 1$ induirait des courants plus rapides que la sous-unités $\alpha 2$. A l'inverse, la sous-unité $\alpha 5$ qui constitue environ 25 % des récepteurs $GABA_A$ de l'Hippocampe et qui apparaît particulièrement enrichie au niveau du radiatum (Sur et al., 1998 ; Pirker et al., 2000), contribuerait à la génération d'évènements plus lents mais de grande amplitude (Zarnowska et al., 2009). Cependant, l'enregistrement de cinétiques plus ou moins rapides pourrait également refléter la localisation des synapses mises en jeu. En effet, les différentes localisations des synapses GABAergiques et la diversité des interneurons impliqués sont corrélées à une hétérogénéité des amplitudes et cinétiques des évènements postsynaptiques GABAergiques (Pearce, 1993 ; Pearce et al., 1995 ; Banks et al., 1998). Il a par exemple été montré que la stimulation d'interneurons périsomatiques en panier ou bistratifiés induit la génération de courants postsynaptiques inhibiteurs plus amples et plus rapides que ceux produits par les interneurons distaux O-LM (Maccaferri et al., 2000). En effet, le temps de montée (rise time) et de décroissance (decay time) des interneurons exprimant la parvalbumine, la cholecystokinine ou la calbindine, sont plus courts que pour les interneurons exprimant la somatostatine. Ceci est cohérent avec l'expression supérieure de la sous-unité $\alpha 1$ au niveau des synapses faites par les neurones parvalbumine (Somogyi et al., 1996).

e. Connectivité de l'Hippocampe

Le circuit principal intrinsèque de l'Hippocampe est un circuit en série, majoritairement glutamatergique (excitateur), unidirectionnel et intégré dans un circuit fermé plus large (Schultz and Engelhardt, 2014).

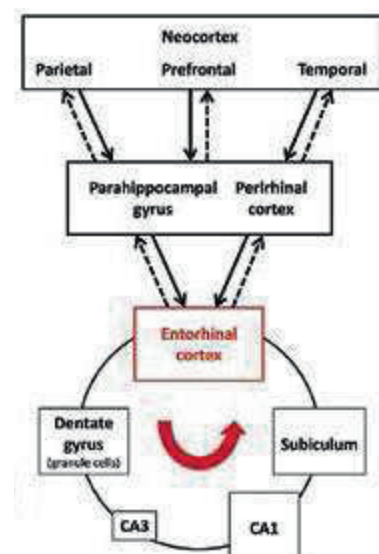
Le Gyrus constitue l'entrée majeure du circuit. Il reçoit les afférences venant de la couche II du cortex entorhinal par la voie perforante (Witter and Amaral, 1991). Plus précisément, les neurones corticaux de la couche II projettent au niveau des deux tiers externes des couches moléculaire du Gyrus et établissent des synapses « en passant » sur les dendrites distales du lacunosum-moléculaire de CA3, alors que ceux de la couche III projettent en CA1 et dans le subiculum. Les neurones granulaires du Gyrus denté projettent leurs axones, les fibres moussues, vers l'Hilus et les dendrites proximales des neurones de CA3. La connectivité précise des neurones du Hilus n'est pas connue, cependant ces neurones donnent des projections locales et associationnelles, c'est-à-dire vers d'autres niveaux sur l'axe rostrocaudal (Freund and Buzsáki, 1996).

Contrairement à ce qui peut être observé chez les rongeurs, peu de projections commissurales sont issues des neurones de l'Hilus chez les primates et l'Homme (Amaral et al., 1984 ; Gloor et al., 1993). Une population particulière de neurones, les cellules mousseuses, génèrent un système fibreux associationnel glutamatergique qui se termine au niveau du tiers interne de la couche moléculaire du Gyrus Denté et connectent les différents niveaux rostrocaudaux du Gyrus denté (Soriano and Frotscher, 1994).

Comme décrit dans le paragraphe précédent, les neurones pyramidaux de CA3 ont la particularité, contrairement à ceux de CA1, de projeter des fibres associationnelles vers d'autres niveaux de CA3 (Swanson et al., 1980 ; Ishizuka et al., 1990). Ils projettent également des fibres collatérales qui se dirigent aussi bien vers d'autres neurones de CA3, que vers CA1 et vers les régions sous-corticales. Les neurones de CA3 donnent naissance au système afférent principal de CA1 : les collatérales de Schaffer. Ces fibres connectent CA1 au niveau des couches oriens et radiatum (Ishizuka et al., 1990).

Les neurones pyramidaux de CA1 projettent quant à eux au niveau du subiculum qui projette lui-même à nouveau vers le cortex entorhinal (Rosene and Van Hoesen, 1977 ; Beckstead, 1978 ; Finch et al., 1983).

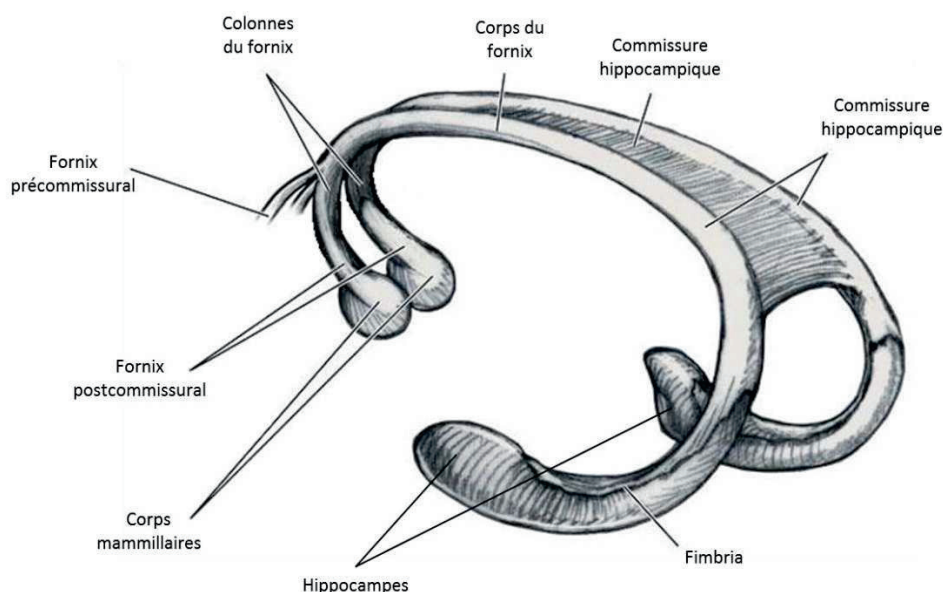
La description classique du réseau extrinsèque auquel participe plus largement la formation hippocampique est basée sur le circuit de Papez (Papez, 1995). Selon ce modèle, l'Hippocampe reçoit l'information sensorielle de différentes régions corticales, intègre cette information puis la transmet via la fimbria et le fornix jusqu'aux noyaux mamillaires où la réponse émotionnelle appropriée est évoquée.



Représentation schématique de la connectivité hippocampique. Schéma issu de Schultz and Engelhardt, 2014.

En réalité, la connectivité de l'Hippocampe avec les autres régions cérébrales est complexe et variée. Il est vrai tout d'abord, que la formation Hippocampique reçoit de très nombreuses afférences corticales. Celles-ci proviennent du Gyrus parahippocampique, du cortex périrhinal, du cortex temporo-polaire, du Gyrus temporal supérieur, du cortex ventro-insulaire, des cortex orbitofrontal et frontal, des cortex cingulaire et rétrospinal (Van Hoesen and Pandya, 1975 ; Van Hoesen et al., 1975 ; Insausti et al., 1987). Ainsi, environ deux tiers des connexions proviennent de cortex d'association multimodale, même si certaines afférences du bulbe olfactif ou du cortex piriforme (unimodales) ont été observées (Krettek and Price, 1977). Les afférences corticales se terminent majoritairement au niveau du cortex entorhinal qui projette réciproquement vers les aires corticales d'origine (Suzuki and Amaral, 1994; Van Hoesen, 1995), de même que CA1 et le subiculum (Ding et al., 2000; Insausti and Muñoz, 2001; Rosene and Van Hoesen, 1977; Yukie, 2000). Le cortex entorhinal et le subiculum reçoivent également des afférences depuis le complexe de l'amygdale (Krettek and Price, 1977).

La voie de sortie « classique » de l'Hippocampe se fait par la fimbria et le fornix. Les fibres qui le constituent se séparent au niveau de la commissure en fibres précommissurales (ou antérieures) qui innervent le septum (Siegel et al., 1975; Alonso and Köhler, 1984) et le noyau accumbens (Groenewegen et al., 1982 ; Swanson and Cowan, 1977), et en fibres postcommissurales (ou postérieures), efférence majeure des noyaux mamillaires du circuit de Papez (Swanson and Cowan, 1975).



Représentation des Hippocampes et des fornix.

De manière intéressante, le septum envoie lui-même de nombreuses afférences cholinergiques et

GABAergiques dans l'Hippocampe au niveau du Gyrus Denté et de CA3 (Mesulam et al., 1983 ; Köhler et al., 1984). L'ensemble de l'Hippocampe, et plus particulièrement le gyrus denté, CA3 et CA2, reçoit des afférences histaminergiques de l'aire supramillaire de l'Hypothalamus (Segal and Landis, 1974 ; Amaral and Cowan, 1980 ; Insausti et al., 1987b). Des afférences noradrénergique, sérotoninergique et dopaminergique proviennent quant à elles respectivement du Locus Coeruleus (Segal and Landis, 1974), du noyau du Raphé (Köhler and Steinbusch, 1982) et de la VTA (Aire Tegmentale Ventrale (Swanson et al., 1980 ; Insausti et al., 1987b)).

Les fibres commissurales qui relient les deux hippocampes par le fornix sont très importantes chez les rongeurs. Le gyrus denté reçoit par exemple par cette voie des fibres de l'Hilus controlatéral. Cependant, la région de l'Hippocampe la plus impliquée dans ces connexions commissurales est l'aire CA3, qui projette controlatéralement en CA1 et en CA3 (Swanson et al., 1980).

Cet aperçu de la connectivité intrinsèque et extrinsèque de l'Hippocampe met en évidence sa position au cœur de l'intégration de l'information sensorielle. Les nombreuses connexions réciproques qu'il établit avec les régions corticales et sous-corticales en font une région privilégiée, un carrefour où l'information est reçue, intégrée et retransmise. Le circuit hippocampique constitue ainsi la base de comportements aussi complexes que l'apprentissage, la mémorisation ou la représentation dans l'espace.

f. Rôle dans la mémorisation et la représentation spatiale

L'intérêt pour l'Hippocampe et sa fonction dans le système nerveux central est apparu suite au célèbre cas du patient H.M. L'homme, qui souffrait d'une forme d'épilepsie incurable, s'est vu retirer pour des raisons thérapeutiques une grande partie des lobes temporaux. Suite à l'intervention, il n'était plus en mesure de former durablement de nouveaux souvenirs, alors que ses souvenirs datant d'avant l'intervention étaient restés majoritairement intacts (Scoville and Milner, 1957; Milner, 2003). Même si l'ablation couvrait d'autres régions cérébrales en plus de l'Hippocampe, comme une partie du cortex rhinal ou les amygdales (Corkin et al., 1997), le cas du patient H.M. a fondé les bases d'un modèle où l'Hippocampe jouait un rôle majeur et indispensable dans l'analyse de l'information et la mémoire.

L'implication de l'Hippocampe dans le processus de mémorisation a été étudiée et en partie confirmée chez les rongeurs grâce à la mise en place de tests comportementaux tel que la « Piscine de Morris » (water maze) ou le « labyrinthe en étoile » (radial arm maze) (Hölscher, 2003). Par exemple, dans le test de la piscine, l'animal est placé dans un bassin d'eau opaque où il doit retrouver sur plusieurs sessions une petite

plateforme cachée sous la surface, lui permettant de sortir de l'eau. Au cours de l'apprentissage, le rongeur met normalement de moins en moins de temps à retrouver la plateforme. Comme attendu, chez les rongeurs ayant subi une lésion de l'Hippocampe, l'apprentissage est plus long et la mémorisation à long terme est réduite (Morris et al., 1982). Le même effet est observé lorsque le fonctionnement de l'Hippocampe est plus subtilement altéré en bloquant les récepteurs au glutamate NMDA avant la tâche d'apprentissage. Cependant, lorsque l'antagoniste est injecté après l'apprentissage, la mémoire à long terme n'est pas affectée. Ceci montre que le réseau de l'Hippocampe est particulièrement impliqué dans la création de la mémoire et non dans la récupération de l'information à long terme (Bannerman et al., 1995 ; Saucier and Cain, 1995 ; Cain et al., 1996 ; Otnaess et al., 1999). Il est cependant important de noter que l'Hippocampe n'est pas indispensable au processus mnésique, dans la mesure il fait partie d'un plus grand réseau (décrit dans le paragraphe précédent) capable de partiellement compenser son dysfonctionnement (Hölscher, 2003).

De plus, avec l'avancée des techniques d'enregistrement de l'activité cellulaire unitaire, il a été mis en évidence que l'Hippocampe était tout spécifiquement impliqué dans la mémorisation spatiale grâce à ses cellules capables de coder une « carte cognitive » de l'espace : les cellules de lieu. Ces cellules, enregistrées chez l'animal éveillé et libre de ses mouvements, s'activent lorsque celui-ci traverse une position particulière dans l'espace, correspondant au champ récepteur ou champ de lieu de la cellule (en anglais « place field » (O'Keefe and Dostrovsky, 1971; Ranck, 1973; O'Keefe and Conway, 1978; Olton et al., 1978)). Avec les cellules «de direction», «de grille», ou «de vitesse», qui permettent le codage de différentes informations spatiales, les cellules de lieu permettent à l'animal de créer une carte mentale de l'espace dans lequel il évolue, et de savoir ainsi où il se trouve. Dans la région CA3 de l'Hippocampe, ces cellules de lieu sont plus stables qu'en CA1 par exemple. Ainsi lorsqu'un environnement varie légèrement, les champs de lieu formés en CA3 sont maintenus, permettant ainsi à l'animal de reconnaître un lieu malgré les changements, on parle de complétion contextuelle (pattern completion (Lee et al., 2004 ; Vazdarjanova and Guzowski, 2004)). Contrairement aux cellules de CA1 ou du Gyrus denté, elles permettent également de différencier deux environnements distincts grâce au recrutement d'une nouvelle population de cellules de lieu, on parle alors de séparation contextuelle (pattern separation) et de « remapping » (Leutgeb et al., 2004 ; Vazdarjanova and Guzowski, 2004). La découverte de ces cellules au rôle particulier a valu le Prix Nobel de Physiologie ou Médecine 2014 aux chercheurs John O'Keefe, May-Britt Moser et Edvard I. Moser.

Outre son implication dans l'apprentissage et la représentation spatiale, le réseau complexe formé par l'Hippocampe semble également être le siège d'altérations liées à des désordres cognitifs tels que la schizophrénie ou l'autisme.

g. Pathologies et altérations développementales

En effet, de nombreuses études post mortem ont suggéré que différentes régions du système limbique, comme le gyrus cingulaire, l'amygdale, le cortex entorhinal ou la formation hippocampique jouaient un rôle central dans la pathophysiologie de la schizophrénie (Simpson et al., 1989, 1998 ; Heckers et al., 1990 ; Reynolds et al., 1990 ; Longson et al., 1996 ; Benes, 2000). Dans l'Hippocampe, une hypofonction GABAergique a été mise en évidence, notamment dans les régions CA3 et CA2 (Benes, 2007). Cette réduction se manifeste par la diminution du nombre de neurones exprimant la Parvalbumine, ou par l'expression réduite de l'isoenzyme GAD67 (Glutamic Acid Decarboxylase 67) qui permet la synthèse du GABA (Zhang and Reynolds, 2002; Benes et al., 2007). Afin d'étudier la physiopathologie de la schizophrénie, de nombreux modèles animaux ont été mis en place. Parmi ces modèles, certains sont pharmacologiques et miment les symptômes de types schizophréniques par l'injection de composés psychomimétiques (comme la kétamine ou le PCP) alors que d'autres sont basés sur des mutations génétiques. Il existe également des modèles dits développementaux, fondés sur une perturbation du développement cérébral (Lodge and Grace, 2009). Parmi eux, le modèle MAM consiste à injecter une rate à 17 jours de gestation avec un antimétabolite, le méthylxazoxyméthanol, altérant ainsi la neurogénèse. Les rats issus de cette portée présentent dès l'adolescence des symptômes de type schizophréniques et des altérations histologiques au niveau de l'Hippocampe similaires à celles observées post mortem chez les patients atteints de schizophrénie (Lodge, 2013). Ce type de modèle souligne la possible origine neurodéveloppementale d'une maladie comme la schizophrénie. L'altération développementale en question pourrait être liée à une infection au cours de la maternité, comme le montre le modèle d'activation immunitaire maternelle (MIA). Ce modèle animal de la schizophrénie consiste à susciter une réponse immunitaire chez la rate à 15 jours de gestation en simulant une infection virale par l'injection d'acide polyinosinique-polycytidylique (Poly I-C) ayant pour conséquence l'apparition de symptômes similaires à ceux de patients schizophrènes (Wolff et al., 2011).

L'importance critique de la période développementale dans la physiopathologie de la schizophrénie s'applique également à l'autisme, par ailleurs associé à une réduction de la connectivité cérébrale (Courchesne et al., 2005) et un déséquilibre de la balance excitation/inhibition (Rubenstein and Merzenich, 2003). Il a par exemple été montré sur un modèle génétique de l'autisme (Neurologine-4), une diminution du nombre de synapses GABAergiques périssomatiques au niveau des neurones pyramidaux de CA3 d'animaux juvéniles (Hammer et al., 2015). Cette réduction est associée à une diminution du nombre d'évènements GABAergiques postsynaptiques. A l'inverse, une augmentation du nombre d'évènements GABAergiques (et non glutamatergiques) dès la première semaine postnatale a été mise en évidence sur un modèle génétique

similaire (Neurologine-3 (Pizzarelli and Cherubini, 2013)). De manière intéressante, cette augmentation est corrélée à celle d'une activité de réseau de l'hippocampe caractéristique de la période postnatale, les GDPs (Giant Depolarizing Potentials, voir chapitre 1 paragraphe II-d). Chez les souris BTBR (BTBR T+tf/J), un autre modèle reconnu d'autisme idiopathique mais dont le fond génétique n'est pas encore élucidé, une augmentation similaire de la transmission GABAergique est observée mais elle est cette fois-ci corrélée à une diminution de la fréquence des GDPs (Cellot et al., 2016).

L'ensemble de ces observations mettent en évidence l'importance critique de la période développementale dans l'émergence de ces désordres neuropsychiatriques. Cette fenêtre temporelle correspond à la mise en place des réseaux neuronaux du système nerveux central. En effet, au stade embryonnaire, alors que les régions se forment, les différentes populations de neurones se mettent en place, se différencient et se développent pour former les connexions appropriées, support d'une activité neuronale encore immature à la naissance puis pleinement fonctionnelle au fur et à mesure du développement.

II. Développement de l'Hippocampe

a. Neurogenèse hippocampique

Au stade embryonnaire, le télencéphale est constitué en dorsal du pallium et en ventral du subpallium (Nadarajah and Parnavelas, 2002). Le pallium donne naissance au néocortex et à l'Hippocampe, alors que le subpallium donne les ganglions de la base ainsi que la majorité des interneurons hippocampiques.

Les neurones pyramidaux glutamatergiques

Au niveau du pallium du télencéphale, le neuroépithélium dont est issu l'Hippocampe tapisse la paroi des ventricules (zone ventriculaire) et peut être divisé en trois parties correspondant aux différentes populations cellulaires qui constitueront la structure : le neuroépithélium des cornes d'Ammon dont proviennent les neurones des couches pyramidale, oriens et radiatum, le neuroépithélium denté qui va donner les cellules granulaires ainsi que les neurones constituant l'Hilus et la couche moléculaire, et enfin l'épithélium glial dont sont issues les cellules gliales de la fimbria (Altman and Bayer, 1990a).

Chez la souris, les cellules pyramidales glutamatergiques sont générées aux alentours de 14-15 jours de gestation (E14-15) pour la région CA3, et légèrement en décalé, vers E15-16 pour CA1 (Soriano et al., 1986, 1989a, 1989b). Un jour après leur génération, les cellules pyramidales migrent hors du neuroépithélium et forment une bande de cellules dans la zone intermédiaire le long du ventricule avant de quitter cette bande

pour traverser la sous-plaque hippocampique, future stratum oriens, et atteindre la plaque hippocampique, future couche pyramidale (Altman and Bayer, 1990a, 1990b). Quatre jours sont nécessaires aux neurones pyramidaux de CA1 pour rejoindre leur destination, un peu plus pour les neurones de CA3 qui doivent suivre la courbe formée par l'Hippocampe en formation. La couche pyramidale est reconnaissable dès 20 jours embryonnaires en CA1, 22 en CA3, malgré qu'à P0, soit 0 jour postnatal correspondant au jour de la naissance de l'animal, certaines cellules pyramidales continuent à migrer vers la couche correspondante. Les cellules granulaires du Gyrus denté sont générées beaucoup plus tardivement, puisque 85 % sont générées seulement après la naissance. Cette genèse débute à 20 jours embryonnaires avec un pic au cours de la première semaine postnatale (Altman and Bayer, 1990c, 1990a). Le gyrus denté est cependant reconnaissable morphologiquement dès E21-22.

Les interneurones GABAergiques

Les interneurones, neurones GABAergiques inhibiteurs principalement situés au niveau des couches dendritiques, stratum oriens, radiatum, moleculare, ou au niveau de l'Hilus, sont quant à eux générés avant la majorité des cellules glutamatergiques pyramidales et granulaires. Chez la souris, les interneurones sont générés entre E11 et E17 (Soriano et al., 1986, 1989a, 1989b). Plus précisément, la majorité des interneurones constituant les couches oriens et radiatum de CA1 et CA3 sont générés vers E12-13, alors que les interneurones du gyrus denté apparaissent à E13-14 (Soriano et al., 1989a, 1989b). Les interneurones GABAergiques présents au niveau de la couche pyramidale elle-même sont générés après les autres et suivent le même gradient de migration que les neurones pyramidaux glutamatergiques (Bayer, 1980; Soriano et al., 1989a).

Les interneurones diffèrent des cellules pyramidales de par leur origine et leur mode de migration. Alors que les neurones glutamatergiques sont générés au niveau du neuroépithélium de la zone ventriculaire du télencéphale dorsal et migrent radialement au travers de la zone intermédiaire pour atteindre la plaque hippocampique, les interneurones GABAergiques sont issus de différents progéniteurs et adoptent des modes de migration à la fois tangentielle et radiale (Parnavelas et al., 1991; Mione et al., 1994). Ainsi, les neurones glutamatergiques issus d'une même cellule mère restent spatialement proches alors que les interneurones sont dispersés suite à une migration tangentielle (Tan et al., 1998).

Le subpallium, qui donne la majorité des interneurones hippocampiques qui vont ensuite migrer tangentiellement vers l'Hippocampe, est constitué de différentes régions prolifératives : les éminences ganglionnaires médiale (EGM), latérale (EGL) et caudale (EGC) (Anderson et al., 1997). Ces régions pourraient être différemment impliquées dans la genèse des sous-types d'interneurones. Il a par exemple été montré que dans l'Hippocampe, les interneurones dérivés des EGM sont majoritairement PV+, environ 30 % contre 13 % de CB+ et 26 % de SOM+ (Nery et al., 2002). A l'inverse, aucun des neurones issus des LGE ne

présentent de cinétiques de dépolarisation rapides (Butt et al., 2005). Quant aux CGE, les neurones qui y sont générés à E13.5 sont essentiellement CB+ (17 %) et SOM+ (27 % (Nery et al., 2002)) alors que ceux générés à E14.5 seraient CR+ (Xu et al., 2004). Ainsi, des différences de localisation et de date de neurogenèse semblent être responsable de la production des différents interneurones. Les interneurones ainsi générés vont ensuite migrer tangentiellement vers leurs destinations finales selon deux flux distincts : l'un dans la zone sous-ventriculaire (SVZ) ou intermédiaire, l'autre dans la zone marginale (Danglot et al., 2006). La zone marginale au niveau de l'Hippocampe correspond au futures strata radiatum et lacunosum-moleculare. Une fois dans le télencéphalon, les interneurones peuvent changer de direction et de modes de migration pour passer d'une zone à l'autre et finalement atteindre leur destination définitive. Aux alentours de P0, la majorité des interneurones GABAergiques sont présents dans l'Hippocampe au niveau de la zone marginale (futur radiatum), de la zone sous-plaque (futur oriens) et dans la zone marginale denté (futur couche moléculaire), alors qu'ils sont majoritaires à proximité des couches pyramidales et granulaires chez l'adulte (Dupuy and Houser, 1996, 1997; Frahm and Draguhn, 2001). Puisqu'aucun phénomène majeur d'apoptose n'a été décrit, les neurones GABAergiques migreraient depuis les couches dendritiques vers les couches somatiques au cours du développement postnatal (Danglot et al., 2006). Parallèlement, leur morphologie évolue d'une forme bipolaire à une forme mature pyramidale (Morozov and Freund, 2003 ; Morozov et al., 2006).

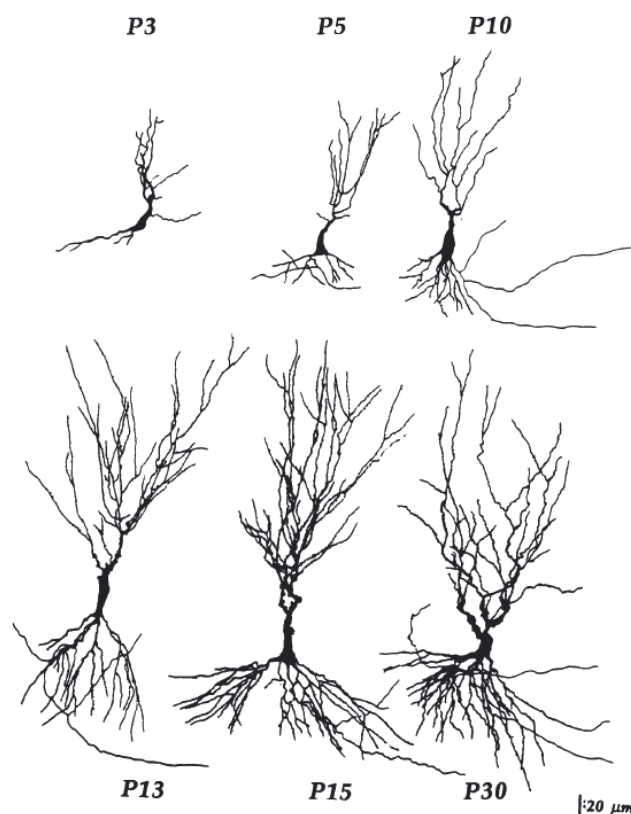
Bien qu'à la naissance l'ensemble des neurones constituant le réseau hippocampique soit globalement en place, la connectivité n'est pas encore établie, notamment celle des neurones pyramidaux dont la fonctionnalité va être corrélée à leur croissance dendritique (Tyzio et al., 1999).

b. Développement morphologique et connectivité des neurones pyramidaux

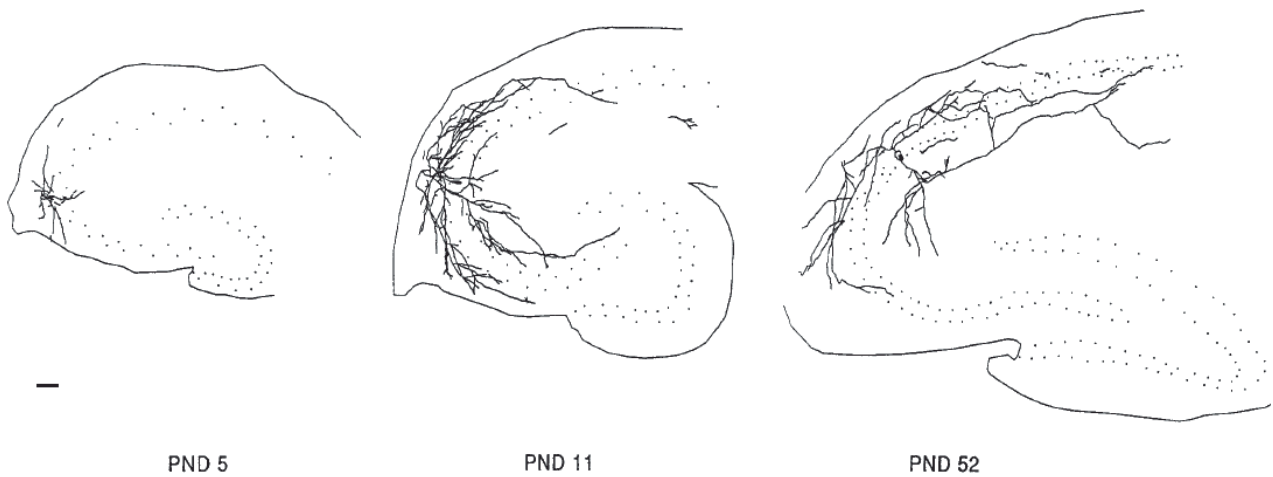
Les neurones pyramidaux présentent dès les premiers jours postnataux une morphologie polarisée héritée des prolongements acquis par les précurseurs au cours de leur migration (Calderon de Anda et al., 2008). Ainsi, à P0 les neurones sont déjà pourvus d'un axone basal et commencent à développer leur dendrite apicale (Tyzio et al., 1999). Dès les premiers jours postnataux en CA3, les dendrites primaires apicales s'étendent sur toute l'épaisseur du stratum radiatum alors que les dendrites basales croissent dans le stratum oriens (Gaiarsa et al., 1992). L'arborisation se développe ainsi rapidement au cours des deux premières semaines de développement avec la présence de nombreux filopodes à P3-P4, et l'augmentation drastique des embranchements entre P5 et P15-17 où le neurone atteint une morphologie mature. En parallèle du développement neuritique apparaissent les premières épines, structures des futures synapses excitatrices. Les épines non moussues, qui vont recevoir les fibres récurrentes, commissurales et

perforantes, apparaissent vers P4-P5 en oriens et en radiatum et leur nombre augmente progressivement jusqu'à P20 (Gaiarsa et al., 1992). Les excroissances épineuses qui vont recevoir les fibres moussues du Gyrus denté apparaissent tout juste à partir de P5-P10 sur la portion proximale des dendrites apicales, au niveau du stratum lucidum. Leur aire totale par neurone, qui correspond alors à respectivement 0.53 et 6 % de l'aire mesurée chez l'adulte, ainsi que leur nombre va augmenter massivement jusqu'à P17 (Gaiarsa et al., 1992). Cette évolution ne dépend pas du développement des fibres moussues mais correspond cependant à leur arrivée au niveau du stratum lucidum qui débute à P3 et s'accompagne de l'apparition d'expansions le long de l'axone vers P7 (Amaral and Dent, 1981).

Au cours de la période postnatale, les neurones pyramidaux vont également développer leurs axones. L'arbre axonal s'étend aussi bien en oriens qu'en radiatum de CA3 et apparaît plus dense et plus complexe au cours de la deuxième semaine postnatale que chez l'adulte (Gomez-Di Cesare et al., 1997). Cette croissance est accompagnée de l'augmentation du nombre de renflements, ou varicosités, le long de l'axone qui établissent des contacts synaptiques en CA3, notamment les connexions récurrentes particulière aux neurones pyramidaux de CA3.



Croissance de l'arborisation dendritique des neurones pyramidaux de CA3 au cours du développement postnatal. Reconstruction en chambre claire issues de (Gaiarsa et al., 1992).



Croissance de l'arborisation axonale des neurones pyramidaux de CA3 au cours des deux premières semaines de développement postnatal à 5, 11 et 52 jours postnataux. Reconstitutions informatiques issues de Gomez-Di Cesare et al., 1997. La barre d'échelle correspond à 100 μ m.

Le développement des épines, excroissances épineuses et renflements axonaux, témoigne de l'intense synaptogenèse se déroulant dans l'Hippocampe au cours des trois premières semaines de développement postnatal (Steward and Falk, 1991; Danglot et al., 2006). Mais les premières synapses fonctionnelles au niveau des neurones pyramidaux ne sont pas les synapses excitatrices glutamatergiques mais les synapses GABAergiques (Tyzio et al., 1999). A P0, les neurones pyramidaux ne sont pas tous au même stade de croissance. Ainsi, ceux qui sont dépourvus de dendrites suffisamment longues pour atteindre la couche radiatum ne présentent aucune activité synaptique (spontanée ou évoquée). Les neurones dont les dendrites sont présentes au niveau du stratum radiatum présentent une activité synaptique uniquement GABAergique. Enfin, lorsque l'arborisation dendritique atteint le stratum lacunosum/moleculare, les neurones présentent une activité synaptique GABAergique et glutamatergique. Cette étude, suggère que la croissance dendritique des neurones pyramidaux détermine la mise en place des différentes voies de signalisations. Comme pour les synapses glutamatergiques, la synaptogenèse GABAergique est très importante au cours des deuxième et troisième semaines postnatales (Seress and Ribak, 1990). Le nombre de synapses GABAergiques axo-somatiques au niveau du stratum pyramidal de CA3 augmente par exemple fortement entre P7 et P21 (Marty et al., 2002).

c. Développement des propriétés électrophysiologiques

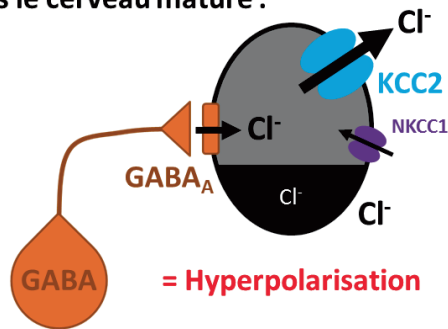
Alors que les neurones pyramidaux se développent morphologiquement, la surface membranaire grandit et provoque une augmentation de la capacitance de membrane associée à une diminution de sa résistance (Shao and Dudek, 2009 ; Tyzio et al., 2003). De plus, le potentiel de repos de la membrane s'hyperpolarise, en adéquation avec l'augmentation des conductances potassiques, la diminution de la

perméabilité au chlore et la réduction de la concentration intracellulaire en chlore (Ben-Ari et al., 1989 ; Spigelman et al., 1992 ; Zhang et al., 1991 ; Wang et al., 2001).

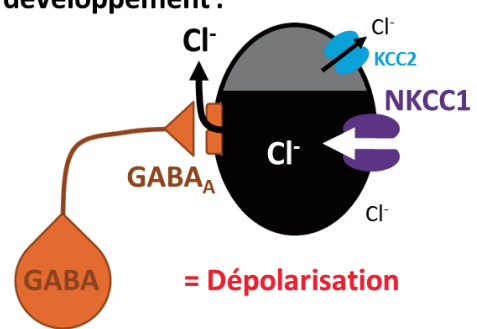
Les transmissions GABAergique et glutamatergique sont également modifiées au cours du développement. Tout d'abord, leur fréquence augmente avec la synaptogenèse (Hosokawa et al., 1994 ; Cohen et al., 2000). Les événements postsynaptiques deviennent moins amples et plus rapides, avec des cinétiques de montée et de décroissance plus courtes (Cohen et al., 2000 ; Hsia et al., 1998). Ces variations de propriétés pourraient s'expliquer pour les événements GABAergiques par la mise en jeu de différentes populations d'interneurones, avec différentes localisations synaptiques (voire paragraphe Id). Elles peuvent également s'expliquer par le changement des sous-unités qui constituent les récepteurs GABAergiques et glutamatergiques. Par exemple, les récepteurs glutamatergiques NMDA immatures sont principalement constitués de la sous-unité NR2B (GluN2B) qui est progressivement remplacée au cours du développement par la sous-unité NR2A (GluN2A) permettant un courant plus rapide (Monyer et al., 1994). De même pour les récepteurs GABA_A, dont l'expression des sous-unités $\alpha 2$ et $\alpha 5$ associées à des cinétiques relativement lentes (voire paragraphe Id) diminue en CA1 et CA3 après P12 (Laurie et al., 1992).

Par ailleurs, la transmission GABAergique au cours du développement est caractérisée par un changement majeur puisque son effet postsynaptique hyperpolarisant et inhibiteur sur un neurone mature est dépolarisant et donc excitateur sur un neurone immature (Ben-Ari et al., 2012). Ce shift est lié au changement d'expression des transporteurs chlore NKCC1 et KCC2 au cours du développement. Ces transporteurs régulent la concentration intracellulaire en chlore. Ainsi, au cours de la première semaine postnatale le transporteur NKCC1 très actif accumule les ions chlores dans le compartiment intracellulaire. L'activation du récepteur GABA_A induit alors la sortie des ions chlore dans le milieu extracellulaire et donc la dépolarisation membranaire. A partir de la deuxième semaine postnatale, l'activité du transporteur NKCC1 diminue alors que l'expression du transporteur KCC2 augmente (Rivera et al., 1999; Li et al., 2002; Dzhala et al., 2005; Romo-Parra et al., 2008). La concentration intracellulaire en chlore diminue et l'activation du récepteur GABA_A produit l'effet inverse, c'est-à-dire l'entrée d'ions chlore et donc l'hyperpolarisation de la membrane.

Dans le cerveau mature :



Pendant le développement :



Représentation schématique du changement de conductance Cl^- au cours du développement postnatal, responsable du shift excitateur/inhibiteur du neurotransmetteur GABA. Schéma inspiré de Ben-Ari et al., 2012.

Dans la période postnatale, le GABA constitue ainsi la principale transmission excitatrice, ce qui va être initiateur en CA3 d'une activité de réseau immature nécessaire à la maturation des connexions synaptiques : les Potentiels Géants Dépolarisants (GDPS pour Giant Depolarizing Potentials).

d. SPAs et GDPs, des activités de réseau développementales

Durant la période postnatale, le réseau neuronal de l'Hippocampe est le siège de plusieurs formes d'activités spontanées de synchronisation.

Les premiers patterns d'activation sont les SPAs, pour Synchronous Plateau Assemblies (Crépel et al., 2007; Allene et al., 2012). Les SPAs sont des décharges en bouffées de plateaux calciques générés dans un groupe distinct de neurones couplés par un système de jonctions GAP. Leur génération n'est pas synaptique puisque les SPAs sont maintenus en présence de bloqueurs de l'activité glutamatergique et GABAergique (Crépel et al., 2007). L'apparition périnatale des SPAs est directement liée à la naissance puisqu'elle dépend de la libération d'oxytocine pendant la parturition. En effet, l'application d'oxytocine à un stade embryonnaire entraîne l'apparition des SPAs avant la naissance, alors que l'application d'un antagoniste du récepteur à l'oxytocine à la naissance la retarde (Crépel et al., 2007). De manière intéressante, l'hormone maternelle oxytocine a également été associée au shift excitateur/inhibiteur du GABA, en réduisant l'activité du transporteur chlore NKCC1 responsable de l'accumulation intracellulaire en chlore (Tyzio et al., 2006). L'hyperpolarisation membranaire ainsi induite par l'oxytocine maternelle pourrait être une condition nécessaire à la génération du courant I_h dont dépendent les SPAs (Crépel et al., 2007). De plus, la population de neurones participant à la production des SPAs évolue au cours des premiers jours post-nataux (Allene et al., 2012). A P1, 51% des neurones impliqués sont GABAergiques contre moins de 5 % glutamatergiques. A l'inverse, à P5 90 % des neurones générant des SPAs sont glutamatergiques contre environ 11 %

GABAergiques.

Les SPAs sont progressivement remplacés au cours de la première semaine postnatale par une activité de réseau cette fois synaptique et synchronisée dans une plus large population de neurones : les GDPs (Ben-Ari et al., 1989 ; Crépel et al., 2007 ; Allene et al., 2012). La mise en place de la transmission synaptique pourrait jouer un rôle dans la disparition des SPAs, puisque l'application de bloqueurs synaptiques (NBQX, DAP5, Bicuculline) augmente le nombre de cellules produisant des SPAs (Crépel et al., 2007). De plus, ce sont les mêmes interneurons initialement impliqués dans la génération des SPAs qui sont impliqués à un stade de maturation plus avancée dans la génération des GDPs (Allene et al., 2012). La transition des SPAs vers les GDPs est donc corrélée à la maturation des neurones impliqués (Villette et al., 2016). Ainsi à P1, 9 % des interneurons sont impliqués dans la production de GDPs contre 87 % à P7 (Allene et al., 2012). Ces interneurons forment un « hub », un noyau de neurones hyperconnectés, correspondant aux cellules en panier ainsi qu'à des interneurons projetant à distance (Bonifazi et al., 2009). En adéquation avec leur stade de maturation, la population d'interneurons impliqués dans la génération des GDPs correspond à la première génération de neurones (Picardo et al., 2011 ; Villette et al., 2016).

Les GDPs sont observés au niveau de l'Hippocampe aussi bien *ex vivo* (en tranche aigue (Ben-Ari et al., 1989)), qu'*in vitro* (tranche organotypique en culture (Allene et al., 2012)) et *in vivo* (Leinekugel et al., 2002), et sont conservés au cours de l'évolution des mammifères (Menendez de la Prida et al., 1998 ; Khazipov et al., 2001). Les GDPs correspondent à de larges événements synaptiques portés par des réseaux récurrents (Ben-Ari, 2001). Au niveau des neurones pyramidaux de CA3, le neurotransmetteur GABA libéré par les interneurons en hub active le récepteur GABA_A, ce qui induit la sortie de l'ion chlore dépolarisant ainsi la membrane. Le neurone pyramidal excité relaie l'information par la libération de glutamate. L'interconnectivité caractéristique des neurones de CA3 mène à la synchronisation de l'ensemble du réseau, générant ainsi les GDPs, qui se propagent jusqu'en CA1 (Menendez de la Prida et al., 1998). Les GDPs enregistrés au niveau des neurones pyramidaux de CA3 sont ainsi constitués d'une composante GABAergique et d'une composante glutamatergique plus tardive (Mohajerani and Cherubini, 2005). La fréquence et l'amplitude des GDPs sont diminuées par l'application de l'antagoniste bumétanide du transporteur NKCC1, dont l'activité est responsable de l'effet excitateur du GABA (Allene et al., 2012). Les GDPs disparaissent ainsi au cours de la seconde semaine postnatale, lorsque la transmission GABAergique devient inhibitrice (Allene et al., 2012; Ben-Ari, 2002; Ben-Ari et al., 1989).

Les courants calciques liés à la transmission GABAergique dépolarisante sont connus pour réguler une variété de processus développementaux comme la prolifération, la migration, la différenciation cellulaire, la

formation de synapses et la connectivité neuronale. En particulier, les courants calciques associés au GDPs sont nécessaires au renforcement des synapses glutamatergiques et GABAergiques au cours du développement (Kasyanov et al., 2004; Mohajerani and Cherubini, 2006; Mohajerani et al., 2007).

Pendant longtemps, la recherche en neurosciences a privilégié l'étude des neurones, sans prendre pleinement en compte les autres populations cellulaires qui composent le système nerveux central : les cellules gliales. Au cours des dernières décennies, de plus en plus de données se sont cependant accumulées sur ces cellules et il est aujourd'hui admis qu'elles jouent un rôle actif dans le fonctionnement du cerveau. Parmi ces cellules, la microglie, le macrophage résident du système nerveux central, joue de par son appartenance au système immunitaire un rôle primordial en cas d'agression (lésion, inflammation, dégénérescence neuronales). De nombreuses études ont également démontré son rôle en condition physiologique et particulièrement au cours du développement où elle pourrait participer à la mise en place des neurones et de leurs connexions.

Chapitre 2 – Les cellules microgliales

I. Qu'est-ce que la microglie ?

a. Historique et découverte

Les cellules gliales dont fait partie la microglie furent décrites pour la première fois en 1846 par Rudolf Virchow comme la substance adhésive liant les neurones. Cependant, il faudra attendre le développement de nouvelles méthodes de fixation et d'imprégnation du cerveau pour découvrir et à terme différencier les cellules gliales telles que nous les connaissons aujourd'hui (revue par Tremblay et al., 2015).

Ramon y Cajal publia le premier article entièrement consacré aux neuroglies dans lequel il postula qu'elles permettaient la préservation des circuits neuronaux et évitaient des contacts inappropriés (Ramon y Cajal, 1897). Après lui, son étudiant Nicolas Achucarro décrivit chez le lapin infecté du virus de la rage, des cellules de forme allongée (« rod-cells ») remplies de produits de dégénérescence graisseuse et dont la morphologie semblait adaptée aux régions nécrosées de la couche pyramidale de l'Hippocampe. D'après ces observations, Achucarro émit l'hypothèse que ces cellules adipeuses granulaires, phagocytèrent les neurones dégénérescents et devaient leur morphologie allongée à un mouvement actif entre ces neurones (Achucarro, 1909). Grâce à la mise au point d'une nouvelle technique de marquage à base de tanin et de nitrate d'argent ammoniacal, il fut capable de décrire et différencier deux types cellulaires parmi les neuroglies : les cellules allongées, phagocytes non fibreux, adipeux et granulaires, et les cellules étoilées, fibreuses et pourvue de terminaisons au niveau des vaisseaux sanguins, qui correspondent aujourd'hui aux

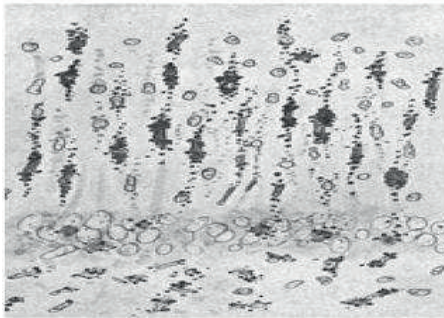
microglies et aux astrocytes (Achucarro, 1913). Dès lors, Achucarro émit l'idée que des dysfonctions gliales pourraient être à l'origine de maladies cérébrales, il opposa ainsi les notions de gliopathie et de neuropathie.

Cependant, en 1913 Ramon y Cajal parlait lui d'un « 3^{ème} élément » en opposition aux neurones et aux cellules étoilées. Contrairement à son étudiant, il décrit des cellules gliales de la substance blanche, petites, sans processus, apolaires, avec une localisation peri-neuronale ou peri-vasculaire et d'origine mésodermique. Il s'avère cependant qu'en raison des limites de la méthode de marquage utilisée (chlorure d'or sublimé), cette classification englobait deux populations de cellules : les microglies et les oligodendrocytes.

A "GRANULADIPOSE" CELLS

Achúcarro, 1909-1913

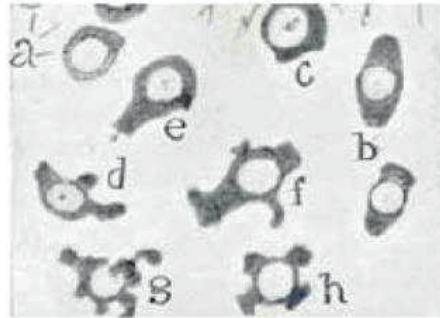
Tannin and ammoniacal silver nitrate method



B "THIRD ELEMENT"

Cajal, 1913

Sublimated gold chloride method



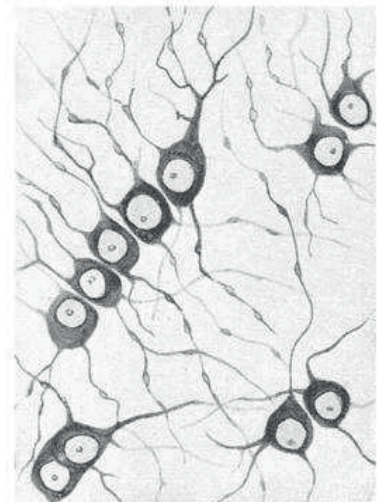
C MICROGLIA



Río-Hortega, 1919 & 1921

Silver carbonate method
Golgi-Hortega method

D OLIGODENDROCYTES



Dessins illustrant la découverte des cellules microgliales, depuis les cellules adipeuses granuleuses de Nicolas Achucarro (A) et le 3^{ème} élément de Ramon y Cajal (B) vers la distinction entre microglies (C) et oligodendrocytes (D) par Pio del Río-Hortega.

Figure issue de Tremblay et al., 2015

En 1916, un ancien étudiant d'Achucarro, Pio del Rio-Hortega, développa une nouvelle méthode de marquage à base de carbonate d'argent qui permit enfin de visualiser la morphologie complexes des cellules gliales (Rio-Hortega, 1916, 1917). Il différencia ainsi les deux types cellulaires du « 3^{ème} élément » de Cajal et décrivit la microglie telle qu'on la connaît aujourd'hui (Rio-Hortega, 1919). Il parle d'une cellule majoritairement présente dans la substance grise, avec un noyau petit et dense, pas de centrosomes, un appareil de Golgi, des granules et une arborisation de processus très développée.

D'après ses observations, la microglie est capable d'adapter sa morphologie aux structures nerveuses qui l'entourent, ce qui suggère une capacité migratoire et une structure dynamique, ce qu'avait décrit Achucarro avant lui concernant les cellules allongées observées en conditions pathologiques. Du reste, pour Rio-Hortega, c'est dans la pathologie que la microglie joue son véritable rôle en passant d'une forme sédentaire ramifiée « au repos », à une forme améboïde « activée » capable de migrer et de phagocytter des débris cellulaires.

Rio-Hortega, note par ailleurs que l'évolution morphologique suivie par la microglie lors de son activation est l'exacte réflexion des caractéristiques acquises au cours du développement. De plus, la cellule présente des vacuoles caractéristiques de la phagocytose très tôt dans le développement, ce qui le mène dès lors à l'hypothèse que les microglies jouent au cours du développement un rôle de macrophage, en phagocytant les débris cellulaires générés par les neurones et les neuroglies dans l'acquisition de leur morphologie et de leur location finale.

b. L'activation microgliale

Malgré ces observations sur un rôle physiologique développemental, les nombreuses études sur la microglie qui ont suivies se sont fondées sur le concept « d'état de repos » et « d'état activé » de la microglie. L'activation microgliale a donc été intensivement étudiée dans différentes conditions pathologiques ou après induction artificielle.

La signalisation « ON/OFF »

De nombreuses molécules et conditions peuvent induire l'activation microgliale. Elles ont en commun de refléter une menace pour l'intégrité structurelle et fonctionnelle du système nerveux central. Grâce à l'expression de très nombreux récepteurs à sa membrane, la microglie est capable de reconnaître et de réagir à une grande variété de signaux témoins de l'homéostasie de son environnement (voir le tableau ci-dessous tiré de la revue de Hanisch et Kettenmann, 2007).

Catégorie de signaux	Exemples
Structures de surface ou AND/ARN d'origine virale, bactérienne ou fongique	Agonistes des membres de la famille des récepteurs à reconnaissance de motif TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR6/2 et TLR9, comme le LPS bactérien ou les protéoglycane et acide lipotéichoïque (LTA) de la membrane bactérienne, les protéines gp41, gp120
Protéines endogènes anormales	Les agrégats de protéine bêta amyloïde, les fragments Aβ(25–35), Aβ40, Aβ42, protéine prion (PrP)
Complément	Les facteurs du complément C1q, C5a
Anticorps	Immunoglobulines de différents classes et sous-types (IgA, IgG, IgM) présentes au niveau de complexes immunitaires
Cytokines	M-CSF, GM-CSF, IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IFN-gamma, TGF-beta, TNF-alpha
Chimiokines	Ligands des récepteurs des chimiokines : CCR3, CCR5, CXCR2, CXCR, CXCR4, CX3CR1, IL-8R
Facteurs neurotrophiques	BDNF (Brain-derived neurotrophic factor), GDNF (glial-derived neurotrophic factor), NGF (nerve growth factor), NT-3 (neurotrophin 3), NT-4
Composants plasmatiques	Albumine, fibronectine, fibrinogène, thrombine
Autres protéines et peptides	Apolipoprotéine E (ApoE), hsp60 et hsp70 (heat shock proteins), CD40L, MSH (melanocyte-stimulating hormone), endothéline, protéine S100, VIP (vasoactive intestinal peptide)
Composés liés à la neurotransmission	ATP (et autres purines), agonistes β adrénergiques, glutamate, kaïnate, NMDA
Ions	K ⁺ , Mn ²⁺
Autres composés	Cannabinoïdes, céramide, gangliosides, acide lysophosphatidique (LPA), mélatonine, opioïdes (endomorphines), PAF (platelet-activating factor), prostaglandine E2 (PGE2), hormones stéroïdes, vitamine D3

Deux principes de signalisation organisent la réponse microgliale : les signaux « ON » et « OFF » (Biber et al., 2007; Hanisch and Kettenmann, 2007; Kettenmann et al., 2011).

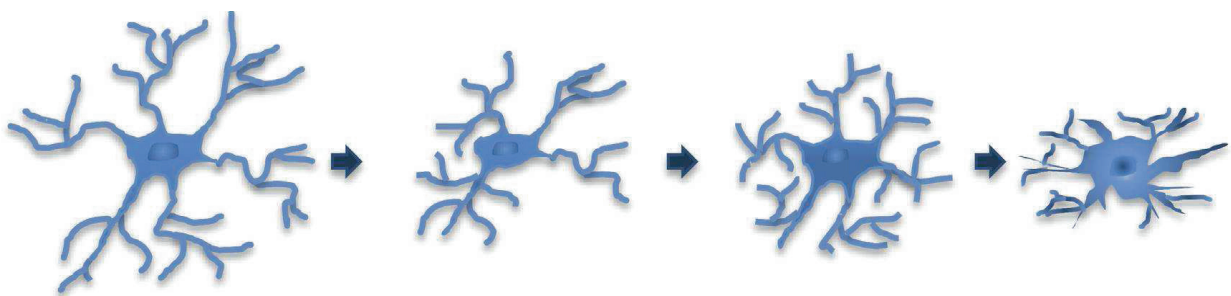
Les signaux « ON » comprennent l'apparition de facteurs inhabituels (comme des structures microbiennes ou des composants du sérum), anormalement concentrés (comme des constituants intracellulaires), caractéristiques de certaines conditions (comme le complément en cas d'opsonisation, ou un complexe antigène-immunoglobuline) ou tout simplement anormaux (agrégation de protéines). Ces signaux sont les témoins d'une agression du système nerveux central, infection ou lésion. Par exemple, la famille des récepteurs à reconnaissance de motif, comme les récepteurs Toll-like (TLRs), détectent et différencient les structures virales bactériennes et fongiques (Olson and Miller, 2004; Trinchieri and Sher, 2007). Parmi ces structures, le lipopolysaccharide (LPS), endotoxine essentielle de la membrane externe des bactéries, est un agoniste du récepteur TLR4 et sert de modèle commun dans l'étude de l'activation microgliale.

D'autre part, il existe des signaux constitutifs avec un effet « calmant » ou « OFF » sur l'état d'activation de la microglie, et c'est la modification de ces signaux qui va constituer une alerte et induire l'activation

microgliale. Les neurotransmetteurs, témoins d'une activité neuronale normale, constituent l'un des signaux « OFF ». En effet, puisqu'elle exprime à sa surface les récepteurs de la plupart des neurotransmetteurs (Färber and Kettenmann, 2006; Kettenmann et al., 2011), la microglie est sensible et réactive à un changement de concentration pouvant indiquer une lésion. De manière intéressante, l'activation de certains de ces récepteurs peut être liée à une réponse antiinflammatoire de la microglie (comme dans le cas des récepteurs adrénérgiques ou GABAérgiques). D'autres paires ligand-récepteur jouent le rôle de signalisation "OFF" : CD200-CD200R, SIRPalpha-CD47 et CX3CL1-CX3CR1 (Barclay et al., 2002; Brooke et al., 2004; Cardona et al., 2006) et induisent donc l'activation microgliale en cas d'absence. Parmi ces voies de signalisation, la voie CX3CL1-CX3CR1 implique la mise en jeu de la Fractalkine, une chimiokine exprimée et libérée par les neurones, et de son récepteur spécifique CX3CR1 exprimé par la microglie. Cette communication neurone-microglie est principalement connue pour son effet « OFF » sur l'activation microgliale mais apparaît également particulièrement importante pour le développement cérébral (description paragraphe III). En complément de ces signaux "OFF", il existe également des inhibiteurs de l'activation microgliale comme l'interleukine (IL)-10, le facteur de croissance TGF- β , les glucocorticoïdes ou le complexe TREM-2 -DAP12 (Broderick et al., 2000; Hamerman et al., 2006; Hanisch and Kettenmann, 2007).

Changement de morphologie et recrutement

Alors que la microglie ramifiée « au repos » est constitutivement présente dans le CNS sain, sa forme activée est observée dans la majorité des pathologies cérébrales. Elle se caractérise morphologiquement par l'épaississement des processus, la diminution de leur nombre et de leur complexité ainsi que la déformation et l'augmentation du volume de son corps cellulaire (Sheng et al., 1997 ; Walker et al., 2014). Ces paramètres peuvent être quantifiés relativement aisément et permettent de distinguer différents phénotypes de microglie associés à différents stades d'activation : ramifiée, amorcée, réactive et améboïde (Kreutzberg, 1996 ; Soltys et al., 2001 ; Stence et al., 2001 ; Kettenmann et al., 2011 ; Kozlowski and Weimer, 2012).



Représentation des changements morphologiques subis par la microglie au cours de son activation. Illustration issue de Walker et al., 2014.

Même si ces stades d'activation ne font pas l'unanimité selon les études (Davis et al., 1994; Streit et al., 1999; Stence et al., 2001; Yamada and Jinno, 2013), il existe un consensus pour dire que la microglie réoriente ses processus vers le site de l'altération, puis perd ses ramifications, devenant plus améboïde avant de développer des filopodes lui permettant de devenir pleinement mobile et de jouer son rôle premier de macrophage du système nerveux central en phagocytant les débris cellulaires issus de la mort neuronale (Walker et al., 2014).

En effet, en conditions pathologiques comme en cas de lésion, d'AVC, de maladies neurodégénératives ou d'invasion tumorale, la microglie est recrutée sur le site d'agression. Ce recrutement est médié par les phénomènes de migration, de prolifération et est parfois accompagné de l'invasion de monocytes circulants (Gomez-Nicola and Perry, 2015). Les cinétiques et mécanismes derrière ce recrutement ont été particulièrement explorés *in vitro* et *ex vivo*. De nombreuses molécules pouvant servir de signaux de migration ont ainsi été mises en évidence : les neurotransmetteurs (ATP, Glutamate), les cannabinoïdes, l'acide lysophosphatidique, la morphine, la bradykinine, les facteurs de croissance, l'amyloïde β ou encore certaines chimiokines (Kettenmann et al., 2011).

Parmi elles, il a été montré que la Fractalkine exerce un effet migratoire fort et dose-dépendant sur des microglies en culture (Maciejewski-Lenoir et al., 1999). L'application de Fractalkine induit un réarrangement du cytosquelette suivi de la migration des cellules. Cette réponse est diminuée par l'anticorps contre CX3CR1 et par des inhibiteurs pharmacologiques de la protéine Gi à laquelle il est couplé. Ces premières observations ont été confirmées par des études réalisées *ex vivo*, grâce à l'imagerie en temps réel d'explants rétinaux. La migration vers le site de lésion induite au laser est ainsi réduite chez les microglies dépourvues du récepteur CX3CR1 (Liang et al., 2009). De même, la migration de microglies quantifiée grâce à un test de migration *in vitro*, est diminuée suite à l'application d'anticorps contre CX3CR1 et augmentée par l'ajout de Fractalkine (Zhang et al., 2012).

D'autre part, la migration microgliale, comme d'autres migrations cellulaires, pourrait également mettre en jeu les canaux et transporteurs ioniques tels que les canaux calciques, chlores ou encore potassique, ce qui est accompagné de modifications des propriétés membranaires (Kettenmann et al., 2011).

Changement du profil électrophysiologique

En parallèle de son changement de morphologie, la microglie subit des changements de propriétés de membranes au cours de son activation. Même s'il ne s'agit pas d'une cellule électriquement excitable comme les neurones, la microglie exprime de nombreux canaux ioniques qui lui confèrent des propriétés électrophysiologiques caractéristiques (Kettenmann et al., 2011).

Que cela soit sur tranche aigüe de rats ou de souris, sur tissu sain les microglies ramifiées sont caractérisées par une résistance d'entrée élevée ($\approx 2.4 \text{ G}\Omega$), une faible capacitance membranaire ($\approx 12 \text{ pF}$) et surtout

l'absence de courants voltage-dépendants (Boucsein et al., 2000, 2003). Le potentiel de membrane associé est généralement très bas, d'environ -20 mV (Boucsein et al., 2000) mais une autre population de cellules se distingue avec un potentiel de membrane plus important de -59 mV (Boucsein et al., 2003). Plusieurs études menées dans différents modèles d'activation ont montré que la microglie suivait un profil similaire : l'expression d'un courant potassique à rectification entrante suivie de celle d'un courant potassique sortant à rectification retardée (Boucsein et al., 2000; Lyons et al., 2000; Avignone et al., 2008). L'application de LPS induit également après 48h une augmentation de la capacitance jusqu'à environ 43 pF (Beck et al., 2008). En culture cellulaire, les microglies présentent un profil de base partiellement activé (courant potassique entrant, augmentation de la résistance jusque 4 GΩ et morphologie améboïde ; Kettenmann et al., 1990; Schilling and Eder, 2007).

Ces changements de propriétés électrophysiologiques s'expliquent par la modification de l'expression des canaux potassiques membranaires, comme par exemple la surexpression de la sous-unité Kv1.3 en conditions pathologiques (Färber and Kettenmann, 2005; Menteyne et al., 2009; Kettenmann et al., 2011).

Changement du profil d'expression génique et marqueurs d'activation

En effet, l'activation microgliale s'accompagne de nombreux changements de l'expression génique menant notamment à la production de nombreuses molécules : pro ou anti-inflammatoires, chimiokines, facteurs de croissance (BDNF, GDNF), molécules neurotoxiques et enzymes. Cependant, l'état d'activation n'est pas stéréotypé mais correspond à un spectre de réponses dépendant du type, de l'intensité et de la durée du stimulus déclencheur (Hanisch, 2013). De manière semblable aux autres macrophages et selon les signaux déclencheurs, la microglie peut développer deux états d'activation, classiquement catégorisé en M1 et M2 (Schwartz et al., 2006; Hanisch, 2013; Benarroch, 2013).

Le phénotype microglial M1 correspond à l'activation "classique" et correspond à un phénotype phagocytaire associé à l'activation transcriptionnelle de NF κ B, menant à la production et libération de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1β, IL-6, IL-23, et TNF-α, ainsi que de substances cytotoxiques comme les radicaux libres d'oxygène (NO) ou l'acide quinoléique. M1 se rattache aux systèmes immunitaires inné et acquis et varie selon le stimulus. Par exemple, en réponse aux ligands des récepteurs de type Toll, la microglie de phénotype M1 surexprime MHC I, libère des cytokines pro-inflammatoires, les chimiokines TNF-α et CCL3, les produits de la cyclooxygénase 2, du NO, des espèces réactives de l'oxygène, ou des acides aminés excitateurs comme effecteurs du système immunitaire inné (Block et al., 2007). Par contre, en réponse à la libération d'INF-γ par les lymphocytes auxiliaires Th1, la microglie M1 exprime MHC II, devient une cellule présentatrice d'antigène et libère des cytokines pro-inflammatoires comme effecteurs du système immunitaire acquis (Hanisch, 2013).

Le phénotype microglial M2 correspond quant à lui à l'activation alternative et correspond également à

un phénotype phagocytaire mais est lié à une réponse anti-inflammatoire via la libération d'IL-10 et de TGF- β . Il favorise la réparation tissulaire en libérant des protéines de la matrice extracellulaire (Mosser and Edwards, 2008). Le phénotype M2 est induit par des signaux produits par les cellules apoptotiques (comme Hsp60 qui active TREM2) ou par des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-13) libérée par les cellules auxiliaires Th2.

Il est important de noter que ces deux types d'activation M1 et M2 représentent un spectre de réponses et non deux types cellulaires séparés et que la microglie peut évoluer entre les deux en condition pathologique et ainsi jouer les différents rôles qui lui sont attribués (Benarroch, 2013).

c. Les principales fonctions de la microglie « activée » en conditions pathologiques

Les microglies activées sont observées dans presque toutes les maladies neurologiques, incluant des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la Sclérose Latérale Amyotrophique ; ou encore des maladies infectieuses ou inflammatoires comme la Sclérose Multiple, les Accident Vasculaires Cérébraux et les lésions cérébrales induites par trauma ou radiation (Fu et al., 2014). La microglie activée dans ces différentes pathologies assure plusieurs fonctions, mais que celles-ci soient bénéfiques ou délétères demeure controversé.

Phagocytose

Quel que soit son état d'activation, la microglie est le phagocyte attitré du système nerveux central et permet l'élimination des pathogènes et débris cellulaires pouvant perturber le fonctionnement cérébral. La phagocytose est un type d'endocytose impliquant l'internalisation vésiculaire de particules solides, comme des pathogènes bactériens ou des débris cellulaires, depuis le milieu extracellulaire vers des vacuoles digestives, les phagosomes. Dans la cellule, les phagosomes fusionnent avec le lysosome, un organite permettant la dégradation enzymatique des composants cellulaires (Napoli and Neumann, 2009). La représentation actuelle du processus de phagocytose repose donc sur un modèle en trois étapes : l'attraction par les signaux « trouve-moi », comme l'ATP, l'UTP ou la Fractalkine ; l'activation des voies de signalisation « mange-moi » par la formation de complexes récepteurs microgliaux-ligands comme le LPS pathogène, la protéine Hsp60 issue de cellules apoptotiques, les immunoglobulines (IgG) ou les protéines du complément ; et enfin la digestion en elle-même (Sierra et al., 2013). Cette fonction est essentielle pour le maintien de l'homéostasie du système nerveux car elle permet l'élimination des bactéries pendant une infection, celle de cellules ou de débris cellulaires en cas d'apoptose ou de nécrose mais également celles de portions de cellule (axones), de myéline ou d'agrégats protéique induites au cours de différentes maladies neurologiques (Fu et al., 2014). Elle permet par exemple l'élimination dans une certaine mesure du peptide

A β qui s'accumule au niveau extracellulaire dans la maladie d'Alzheimer et provoque perte neuronale et atteintes cognitives (Koenigsknecht-Talboo and Landreth, 2005). En cas de lésion cérébrale ou spinale, la microglie effectue la phagocytose de la myéline abîmée ainsi que des débris cellulaires, nécessaire à la survie neuronale et à la régénération de la myéline (Boekhoff et al., 2012; Redondo-Castro et al., 2013).

La phagocytose microgliale est donc un phénomène majoritairement bénéfique, cependant elle peut devenir insuffisante ou être perturbée par la maladie, accélérant ainsi sa progression. De plus, des études menées *in vitro* (Neher et al., 2011) et *in vivo* (Fricker et al., 2012; Neher et al., 2013, 2014) ont démontré que la microglie peut activement supprimer des neurones altérés mais potentiellement viables. On parle alors du phénomène de « phagoptose », qui pourrait aggraver la mort neuronale dans certaines maladies neurodégénératives (Brown and Neher, 2014).

Le « stripping » de synapses

Dans certaines situations, les microglies pourraient interagir physiquement avec les neurones lésés mais agir plus subtilement en supprimant uniquement les synapses. On parle de “stripping” ou de déshabillage synaptique. Ce phénomène a été identifié pour la première fois par microscopie électronique dans un modèle de lésion du nerf facial (Blinzinger and Kreutzberg, 1968). Cette lésion qui touche les axones des motoneurones au niveau du noyau facial, provoque l'activation des microglies qui prolifèrent, migrent et recouvrent le corps cellulaire des motoneurones pour à terme supprimer les afférences synaptiques (Moran and Graeber, 2004). Des observations similaires ont été faites au niveau cortical dans un modèle d'inflammation bactérienne par injection de bactéries neutralisées ou de LPS (Trapp et al., 2007; Chen et al., 2014). La suppression des afférences inhibitrices favoriserait la synchronisation neuronale et l'expression de molécules neurotrophiques et anti-apoptotiques, assurant ainsi un rôle neuroprotecteur (Chen et al., 2014). D'autre part, la période de rétraction synaptique coïncide avec l'expression d'oxyde nitrique synthase neuronale et sa manipulation pharmacologique montre qu'en l'absence d'oxyde nitrique le stripping est stoppé (Sunico et al., 2005). L'oxyde nitrique induit quant à lui la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine connue pour induire la rétraction des neurites et pouvant donc expliquer le mécanisme derrière le stripping (Sunico et al., 2010).

Cependant, des études ont montré que la prolifération microgliale n'était pas nécessaire au processus (Kalla et al., 2001; Svensson and Aldskogius, 1993) et aucune preuve formelle ne démontre à ce jour le rôle actif des microglies dans le phénomène de stripping synaptique. En effet, Yamada et al ont montré qu'une diminution de l'activité synaptique (excitatrice et inhibitrice) médiée par la libération d'ATP et adénosine gliales précède le phénomène de stripping par la microglie (Yamada et al., 2008).

Libération de facteurs : de la neurotoxicité à la neuroprotection

Comme décrit précédemment, la microglie activée libère un grand nombre de molécules qui vont, selon la situation, avoir un effet positif ou délétère. Le premier rôle de la microglie est de défendre le système nerveux central. En cela, son recrutement sur le site de l'altération lui permet d'être en première ligne pour phagocyter mais également pour libérer les molécules pro-inflammatoires caractéristiques de son état d'activation orienté M1. Ces substances vont amplifier la réponse inflammatoire, que la nature de l'altération soit due à un pathogène ou à une lésion. Elles vont alors permettre de tuer les pathogènes mais pourront également avoir l'effet indésirable de tuer les neurones. Par exemple, alors que la microglie joue par le phénomène de phagocytose un rôle neuroprotecteur dans la phase pré-symptomatique de la Sclérose Latérale Amyotrophique, elle serait délétère pour les motoneurones voisins par la sécrétion de ces facteurs proinflammatoires dans la phase initiale de la maladie (Graber et al., 2010). Dans la maladie d'Alzheimer, les protéines bêta-amyloïdes favorisent le profil d'activation pro inflammatoire de la microglie et induisent l'expression d'oxyde nitrique synthase suivie de l'apoptose neuronale. Il a par ailleurs été montré que les cytokines pro inflammatoires TNF α et IL-1 β peuvent induire la mort neuronale in vitro et in vivo, via une voie dépendante de caspase-3 (McCoy and Tansey, 2008; Kaushal and Schlichter, 2008). De manière intéressante, l'activation spécifique des récepteurs NMDA exprimés par la microglie provoque in vitro la libération de facteurs neurotoxiques (NO) par la microglie induisant la mort neuronale, et l'inactivation de ces récepteurs in vivo protège les neurones en cas de lésion (Kaindl et al., 2012). Après une certaine période d'activation pro-inflammatoire, la microglie développe son activation alternative majoritairement anti-inflammatoire et peut ainsi calmer l'inflammation et promouvoir la survie neuronale. Il a par exemple été montré que TGF- β régule l'inflammation lors de neurodégénérescence chronique et limite la mort neuronale dans un modèle de maladie à prion (Boche et al., 2006) ou dans un modèle de la maladie de Parkinson, en agissant sur son récepteur microglial T β R-I (Liu et al., 2016).

Modulation de l'activité synaptique

La microglie activée pourrait également agir directement sur l'activité synaptique neuronale. Une étude a par exemple montré que l'activation microgliale par le LPS augmente la fréquence des courants postsynaptiques excitateurs au niveau de l'Hippocampe (Pascual et al., 2012). Les auteurs proposent e modèle selon lequel l'activation microgliale induit le recrutement rapide des astrocytes par la libération d'ATP microglial, les astrocytes amplifient alors la production d'ATP et libèrent le glutamate qui va augmenter la fréquence des courants postsynaptiques via le récepteur neuronal mGluR5. Dans un modèle de sclérose en plaque, la libération d'IL1 β par la microglie réduit la recapture du glutamate en diminuant l'expression d'un transporteur et augmente ainsi la transmission glutamatergique (Mandolesi et al., 2013). De même, la libération d'IL1 β par la microglie suite à l'activation du récepteur CX3CR1 est capable d'induire la facilitation de la transmission synaptique excitatrice dans la corne dorsal de la moelle épinière ex vivo, un mécanisme

pouvant être impliqué dans la douleur chronique (Clark et al., 2015).

Dans un modèle de douleur neuropathique, il a été montré que l'hyperexcitabilité neuronale à l'origine de la douleur pouvait être liée à la modification de la transmission inhibitrice GABAergique par la microglie (Coull et al., 2005). Dans ce cas de figure, la microglie qui surexprime le récepteur P2X4 est activée par un signal purinergique (ATP) et libère en réponse du BDNF. Le facteur se fixant à son récepteur neuronal TrkB entraîne alors la diminution de l'expression du canal KCC2 au niveau des neurones de la corne dorsale ce qui va avoir pour effet comme on l'a vu dans le premier chapitre de l'introduction d'inverser le rôle du neurotransmetteur GABA. En effet, le canal KCC2, donc l'expression est normalement caractéristique des neurones en développement, induit un changement de la répartition des ions Cl⁻ autour de la membrane neuronale, le GABA va alors en activant son récepteur entrainer la sortie d'ion Cl⁻ et donc la dépolarisation membranaire. Les synapses inhibitrices deviennent excitatrices et participent ainsi à l'hyperexcitabilité pathologique du réseau.

d. La microglie « au repos » en condition physiologique ?

Motilité et surveillance active

Contrairement à l'idée reçue d'une microglie au repos, sédentaire et inactive en condition physiologique, des études réalisées in-vivo ont permis de montrer une microglie dynamique, scannant continuellement son environnement à l'aide de ses processus mobiles et répondant rapidement aux changements.

L'imagerie en temps réelle a permis ces dernières décennies de mettre en évidence la motilité constante des microglies dans le SNC en condition physiologique (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005; Nayak et al., 2012). Des vidéos en « time-lapse » réalisée sur culture primaire de neurones de rat ont révélé pour la première fois que les microglies ramifiées sont des cellules dynamiques qui étendent et rétractent continuellement leur processus, suggérant un surveillance active de leur environnement (Booth and Thomas, 1991; Thomas, 1990). Ces études ont également montré chez la microglie une activité pinocytaire, une forme d'endocytose du milieu extracellulaire. D'après ces observations, émergea l'hypothèse selon laquelle la microglie pourrait jouer le rôle de gardien dans le cerveau sain en participant au nettoyage du milieu. L'étude de la motilité microgliale fut alors approfondie, notamment en tranche aigues de cerveaux. Cependant, en raison de la nature lésionnelle de la procédure, les microglies étendent d'abord leur processus vers la surface lésée puis adoptent une morphologie améboïde et migrent pour participer notamment au nettoyage des débris cellulaires (Brockhaus et al., 1996; Dailey and Waite, 1999; Stence et al., 2001). L'étude de la microglie dans son environnement naturel fut permise par le développement de la microscopie deux-photons (TPM) qui rend en effet possible l'observation en temps réel de tissus profonds.

Deux études majeures ont analysé le comportement de la microglie dans le cerveau sain en utilisant un modèle de souris transgénique possédant des microglies fluorescentes ($CX_3CR_1^{+eGFP}$; Jung et al., 2000). Les microglies dans ces conditions très proches de la physiologie, apparaissent stationnaires mais avec des processus hautement mobiles, qui s'étendent et se rétractent à une vitesse d'environ 1.5 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). Sur une période de quelques minutes à quelques heures, de nombreux processus secondaires apparaissent et disparaissent sans changement significatif du nombre total de branchements (Davalos et al., 2005). De plus, en présence d'apyrase, une ATPase qui hydrolyse l'ATP et l'ADP extracellulaire, le mouvement des processus est diminué, ce qui suggère le rôle des nucléotides et donc d'une communication intercellulaire dans la régulation de la motilité basale des processus microgliaux. La dynamique des cellules microgliales est en contraste avec la stabilité des processus neuronaux environnants et conforte la fonction proposée de gardien du SNC.

Motilité modulée par les neurones

Il a été démontré que la motilité microgliale en condition physiologique est sensible et régulée par les neurones. Sur des explants rétinaux, la motilité basale des microglies est réduite lorsque celles-ci sont dépourvues du récepteur CX3CR1 et donc insensibles à la Fractalkine libérée par les neurones (Liang et al., 2009). Une étude plus récente d'imagerie en temps réel a également montré sur des explants rétinaux que la motilité microgliale est positivement régulée par la transmission glutamatergique via l'augmentation de la libération d'ATP après excitation neuronale (Fontainhas et al., 2011). Ces résultats mettent en évidence l'interaction basale entre les microglies et les neurones.

De la même manière que les signaux purinergique et glutamatergique, la neurotransmission inhibitrice semble également impliquée dans la régulation de la dynamique microgliale. Dans la même étude d'explants de rétines, le GABA diminue la vitesse et la motilité des processus, alors que la bicuculline, antagoniste du récepteur GABAA, les augmente. Ces résultats confirment ceux de Nimmerjahn et al., 2005 *in vivo*, qui montrait également une augmentation de la motilité des processus suite à l'application de bicuculline. Cependant, aucun changement de la vitesse elle-même n'est observé suite à l'application de bicuculline *in vivo*, ce qui pourrait refléter des différences entre les préparations utilisées (*in vivo* vs *ex vivo*) ou les régions étudiées (cortex ou rétine). Des divergences plus évidentes apparaissent sur tranche d'Hippocampe *in vitro*, où l'induction du phénomène de potentialisation à long terme (LTP) et donc l'augmentation de la transmission neuronale n'a aucun effet ou à l'inverse diminue la motilité microgliale (Wu and Zhuo, 2008; Grinberg et al., 2011). A l'inverse, la motilité microgliale augmente suite au blocage de l'activité neuronale par l'ajout de tétrodontoxine (TTX) puis diminue à nouveau après l'ajout de glutamate ou d'ATP.

Malgré les divergences, toutes ces études s'accordent pour démontrer que la propension de la microglie à continuellement scanner son environnement en condition physiologique est sensible à la

transmission neuronale et varie en fonction des changements. Il a même été montré que la microglie interagit physiquement avec les synapses. De tels contacts ont été caractérisés *in vivo* grâce à l'utilisation de l'imagerie deux-photons et de souris transgéniques exprimant une protéine fluorescente à la fois dans les microglies et dans les neurones (Wake et al., 2009). Cette étude révèle que les processus microgliaux contactent les éléments synaptiques pendant une durée relativement courte (environ 5 minutes) au niveau des cortex somatosensoriel et visuel. Ces contacts se font à un taux d'environ un par heure et induisent l'élargissement des terminaisons présynaptiques contactées. Tout comme la motilité des processus, ces contacts sont modulés par l'activité neuronale. Ainsi, moins de contacts microglie-synapses ont lieu lorsque l'activité neuronale est diminuée par énucléation, par injection rétinienne de TTX ou par abaissement de la température corporelle. Alors qu'aucune diminution de la motilité générale des processus n'était observée suite à l'application de TTX dans une étude précédente (Nimmerjahn et al., 2005), la diminution des contacts synaptiques pourrait suggérer que les mouvements des processus microgliaux ne sont plus dirigés vers la synapses lorsque celle-ci est inactive. Les auteurs ont également démontré que les contacts normalement courts avec les synapses fonctionnant normalement, sont prolongés en cas de lésion ischémique suite à l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne. Ces contacts anormaux sont souvent suivis de la disparition des structures présynaptiques contactées.

Une étude plus récente menée sur le tectum optique du zebrafish, a montré que les processus microgliaux établissent des contacts "bulbeux" avec les somas des neurones (Li et al., 2012). Ces contacts augmentent avec l'activité neuronale induite par la libération locale de glutamate. De plus, grâce à l'utilisation d'imagerie calcique, les auteurs ont mis en évidence que les microglies contactent préférentiellement les neurones les plus actifs. Enfin, les neurones contactés par les processus microgliaux voient leur activité diminuer suite au contact. Ceci traduit le fait qu'en plus d'être « à l'écoute » des neurones et de modifier son comportement en conséquence, la microglie peut en retour influencer sur l'activité neuronale.

Modulation de l'activité synaptique

L'étude du rôle de la microglie dans la modulation physiologique de l'activité neuronale a été approfondie grâce au développement de nouveaux outils génétiques permettant la déplétion de la population microgliale chez la souris adulte (Parkhurst et al., 2013).

Les auteurs ont généré un modèle murin exprimant la recombinaison Cre de façon inductible par l'application de tamoxifen, et spécifiquement dans la microglie. Cette approche leur a permis de faire exprimer le récepteur de la toxine diphtérique dans les microglies et ainsi de les déléter par l'administration de la toxine. La déplétion microgliale diminue le remodelage des épines dendritiques (formation et élimination) de façon basale mais également suite à une tâche d'apprentissage moteur. Ces souris présentent une altération de l'apprentissage moteur, ainsi que de la mémoire dépendante de l'Hippocampe et de

l'Amygdale. Ces altérations cellulaires et comportementales sont associées à l'expression diminuée de protéines impliquées dans le fonctionnement synaptiques comme la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA ou le transporteur vésiculaire glutamatergique VGluT1. Au niveau fonctionnel, la fréquence des courants postsynaptiques miniatures médiés par les récepteurs AMPA et NMDA est réduite, suggérant la diminution de la libération spontanée de Glutamate chez les souris dépourvues de microglies. Ces résultats démontrent que la microglie est impliquée dans le remodelage des réseaux synaptiques ayant cours lors d'une tâche d'apprentissage.

Afin de trouver le mécanisme moléculaire pouvant faire le lien entre la microglie et le fonctionnement synaptique, les auteurs ont créé une souris dans laquelle l'expression de BDNF est spécifiquement supprimée dans la microglie. Ces souris présentent des altérations similaires aux souris dépourvues de microglies, comme la diminution de la formation de synapses au cours de l'apprentissage et celles des performances comportementales.

Le rôle de la microglie dans le remodelage synaptique lié à l'apprentissage dépend au moins en partie de la libération microgliale de BDNF, régulateur connu de la plasticité synaptique.

Neurogenèse adulte

Bien que le développement cérébral s'achève au moment de l'adolescence, une neurogenèse localisée est toujours possible à l'âge adulte. Chez les mammifères, les progéniteurs neuronaux proviennent principalement de deux régions cérébrales : la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'Hippocampe et la zone sous-ventriculaire, située sous la paroi des ventricules latéraux (Taupin and Gage, 2002). Une partie seulement des neurones générés dans la zone sous-granulaire du Gyrus Denté survit et s'intègre dans les circuits déjà en place (Gould, 1994). La majorité de ces progéniteurs subissent l'apoptose et sont phagocytés par les microglies dans un contexte non-inflammatoire (Sierra et al., 2010). La phagocytose n'est effectivement pas réalisée par des microglies améboïdes « activées » comme en pathologie mais par des microglies ramifiées qui forment des poches de phagocytose à l'extrémité de leurs processus et n'ingèrent pas les débris cellulaires au niveau de leur soma comme elles le font sous leur forme améboïde. D'autre part, la neurogenèse hippocampique peut être affectée par l'enrichissement environnemental, l'apprentissage et l'exercice (Inokuchi, 2011). Or la microglie va jouer un rôle dans ce contexte particulier. En effet, l'enrichissement semble stimuler la prolifération microgliale en même temps que la neurogenèse et les capacités d'apprentissage (Ziv et al., 2006). De plus, l'ensemble de ces effets sont réduits chez des souris immuno-déficiente, ce qui mène les auteurs à proposer le rôle des cellules T s'infiltrant dans la zone sous-granulaire pour activer les microglies et favoriser la neurogenèse. In vitro, l'addition de microglies dérivées de souris entraînées, sur des cultures de neurones hippocampiques augmente le nombre de progéniteurs neuronaux (Vukovic et al., 2012). In vivo, lorsque la fonction microglie est directement altérée par la

suppression du récepteur CX3CR1, la neurogenèse et les capacités d'apprentissage sont diminuées (Rogers et al., 2011). De même, lorsque la fonction microgliale est atteinte par l'application de LPS, l'apoptose des progéniteurs augmente (Sierra et al., 2010). L'ensemble de ces données suggèrent que les microglies jouent un rôle dans la neurogenèse adulte d'une part par la phagocytose efficace mais régulée des débris, d'autre part par la possible libération de substances solubles (Choi et al., 2008).

e. La distribution des cellules microgliales

En adéquation avec son rôle proposé de sentinelle, surveillant activement son environnement, et de modulateur de l'activité neuronale, la microglie est présente dans chaque région du SNC. Cependant, Lawson et al. ont montré dès 1990 que la densité diffère d'un facteur 5 selon la nature du tissu et la région considérée (Lawson et al., 1990). Bien que l'ensemble des études qui ont suivi s'accordent à confirmer une densité microgliale variable selon la région observée, des divergences apparaissent selon les différents modèles animaux et marquages cellulaires utilisés.

Ainsi, Lawson observe tout comme Del Rio-Hortega avant lui, une densité microgliale plus importante dans la substance grise contenant les corps cellulaires neuronaux que dans la substance blanche composée principalement des fibres neuronales (Del Rio-Hortega, 1919 ; Lawson et al., 1990). Bien qu'il ne parvienne pas à mettre en évidence de corrélation entre la distribution microgliale et celle de neurotransmetteurs connus, tel que la dopamine, cette différence pourrait être selon lui liée à la mise en jeu d'un ligand neuronal. Des études plus récentes, effectuées chez la souris (Vela et al., 1995) mais également chez l'homme (Mittelbronn et al., 2001) montrent que la microglie est au contraire plus présente dans la substance blanche. Cette divergence pourrait être liée au modèle d'étude ou au marquage de différentes populations microgliales selon la technique employée. Ces études s'accordent par ailleurs sur le point morphologique et observent majoritairement des microglies avec un petit corps cellulaire rond et des processus radialement développés dans la substance grise et des microglies plus allongées, avec des processus longitudinaux dans la substance blanche, ce qui traduit la dépendance de la microglie à son environnement.

En ce qui concerne les densités relatives de chaque région, quelques disparités apparaissent encore selon les études, mais d'une manière générale les microglies semblent plus présentes dans les régions dopaminergiques (substantia nigra, neostriatum) puis de manière décroissante dans le télencéphale, le diencéphale, le mésencéphale et le reste du rhombencéphale (tronc cérébral et cervelet) (Lawson et al., 1990; Mittelbronn et al., 2001; Savchenko et al., 2000; Yang et al., 2012). Chez l'homme, la distribution au niveau du rhombencéphale apparaît légèrement différente avec une densité microgliale maximale au niveau du bulbe rachidien et du pont cérébral (Mittelbronn et al., 2001).

Au sein même d'une région, la densité peut être homogène ou varier selon les aires. En effet, dans le cortex préfrontal chez le rat, les microglies sont plus denses dans la couche V que dans la couche I mais sont distribuées de manière similaire le long des axes médo-latéral et antéro-postérieur (Kongsui et al., 2014). Dans le cervelet, la densité dépend fortement de la couche cellulaire, de plus en plus importante des couches moléculaire et granulaire, à la substance blanche et aux noyaux cérébelleux (Vela et al., 1995). Dans l'Hippocampe, la distribution des microglies en CA3 est soumise à un gradient dorso-ventral, avec une densité plus faible dans les couches oriens, radiatum et lacunosum-moleculare en ventral (Jinno et al., 2007b). Ainsi, la densité ventrale en CA3 est plus faible que dans les régions CA1 et du Gyrus Denté. Enfin, en dorsal comme en ventral, la densité en CA1 et CA3 est la plus haute dans la couche lacunosum-moleculare. Les auteurs suggèrent qu'une telle régulation de la densité pourrait être liée à une vulnérabilité régionale, notamment avec la prédisposition aux crises épileptiques et à la perte neuronale en CA3 (Jinno et al., 2007b), mais une forte densité microgliale pourrait également exposer le tissu à de plus forts risques d'inflammation comme il a été montré dans la substantia nigra suite à l'application de LPS (Yang et al., 2012).

Excepté en conditions pathologiques, la densité microgliale reste stable chez l'adulte (Vela et al., 1995; Aredo et al., 2015). Ainsi, bien que Lawson et al. n'aient pas montré de relation évidente entre la densité microgliale et les événements développementaux (mort neuronale et activité phagocytaire microgliale), la distribution chez l'adulte selon la région résulte vraisemblablement d'une mise en place au cours du développement du système nerveux central.

II. La microglie au cours du développement

a. L'origine extraembryonnaire des microglies

Lorsqu'Achucarro décrit pour la première fois les cellules adipeuses granulaires, il pense observer une forme intermédiaire entre ces cellules et les astrocytes, ce qui le pousse à les rattacher aux neuroglies et à leur attribuer une origine ectodermique, comme les neurones et les astrocytes (Achucarro, 1913). Plus tard, il fait état de cellules adipeuses granulaires migrant dans le parenchyme cérébral à partir des vaisseaux sanguins, mais aucune méthode ne permet alors de les discriminer des monocytes circulants (Tremblay et al., 2015). Cependant, lorsque Cajal introduit la même année son concept de « 3^{ème} élément » il décrit des cellules péri-vasculaires et suggère une origine plutôt mésodermique, similaire aux monocytes circulants (Cajal, 1913). Rio-Hortega confirme cette théorie et parle de la microglie comme d'une « mésoglie » (Rio-

Hortega, 1919). Il faudra attendre le début du XXI^{ème} siècle et l'arrivée de nouvelles stratégies de cartographie de destinée cellulaire (« fate mapping ») pour établir l'origine unique des cellules microgliales dérivant du sac embryonnaire (Ginhoux et al., 2010 ; Schulz et al., 2012 ; Kierdorf et al., 2013).

En effet, bien que l'hématopoïèse permettant la génération des macrophages chez l'adulte se déroule au cœur de la moelle osseuse, il a été démontré que les microglies ne sont qu'occasionnellement renouvelées à partir de cette source et qu'il s'agit d'une population résidente auto-renouvelée au cours de la vie à partir d'une réserve de cellules établie au cours du développement (Ginhoux et al., 2010). Bien que durant cette période, l'hématopoïèse ait lieu au niveau du sac embryonnaire, puis au niveau du foie fœtal, différentes études ont permis de montrer que la microglie est spécifiquement issue au cours du développement de progéniteurs du sac embryonnaire et dépend de facteurs de transcription distincts des autres populations de macrophages tels que PU.1 et Irf8 (Ginhoux et al., 2010; Schulz et al., 2012; Kierdorf et al., 2013). Malgré tout, il est important de noter que chez l'adulte, une possible origine mixte des microglies n'est pas à écarter. En effet, seulement 30% des cellules microgliales adultes sont marquées dans l'étude de Ginhoux de 2010 et qu'une autre étude réalisée chez le zebrafish suggère une contribution significative de cellules non issues du sac embryonnaire dans le pool de microglies adultes (Xu et al., 2015).

L'hématopoïèse du sac embryonnaire débute dès 7.5 jours embryonnaires (E7.5) chez la souris avec l'apparition des premiers progéniteurs erythromyéloïdes $c\text{-kit}^+$. Un jour plus tard, ces cellules mûrissent progressivement pour former une nouvelle population de progéniteurs $A1\ CD45^+ c\text{-kit}^{\text{lo}} CX_3CR_1^{\text{lo}} F4/80^-$ puis $A2\ CD45^+ c\text{-kit}^- CX_3CR_1^{\text{hi}} F4/80^{\text{hi}}$. Les premiers macrophages primitifs sont observables à E9 au niveau des îlots vasculo-sanguins primitifs puis se propagent par le système sanguin jusque dans le système nerveux central, alors encore au stade de primordium et dépourvu de barrière hémato-encéphalique.

b. La colonisation du système nerveux central par les cellules microgliales

Chez la souris, après avoir infiltré le système nerveux central par le système sanguin, les méninges et les ventricules dès E9.5, la microglie va alors coloniser le cerveau par prolifération et migration jusqu'à sa destination finale, augmentant ainsi progressivement sa densité globale, avec une augmentation importante au cours des deux premières semaines postnatales (Milligan et al., 1991; Navascués et al., 2000). La colonisation microgliale suit alors un motif spatio-temporel défini selon la région concernée qui semble dépendre du développement neuronal de celle-ci.

Les microglies s'accumulent entre le premier et le troisième jour postnatal (P1- P3) au niveau de la

substance blanche, incluant la substance blanche sous-corticale, la capsule interne, les pédoncules cérébraux et la substance blanche cérébelleuse, avant de coloniser la matière grise en suivant les projections axonales, notamment les faisceaux corticorachidiens (Ueno et al., 2013). Dans le cervelet, la densité microgliale augmente au cours des trois premières semaines postnatales, avec deux pics successifs à P10 et P21, quand les phénomènes de neurogenèse, mort cellulaire et synaptogenèse ont lieu (Perez-Pouchoulen et al., 2015). Dans la Substance Noire, région la plus pourvue de microglies chez l'adulte, et le striatum, la densité microgliale augmente au cours des deux premières semaines postnatales alors que les axones des neurones dopaminergiques mésodiencephaliques établissent leurs connections synaptiques avec les neurones du striatum (Sharaf et al., 2012). Il en est de même au niveau du cortex somato-sensoriel associé aux vibrisses, où la colonisation des microglies suit un motif particulier par rapport aux axones thalamo-corticaux formant des clusters en forme de tonneau. En effet, au cours du développement de ces structures, les microglies commencent par encercler les clusters d'axones à P5 puis les infiltrent à partir de P6, à la même période où les synapses se forment (Hoshiko et al., 2012). Le nombre de microglies à l'intérieur de ces clusters augmentent entre P6 et P9 jusqu'à finalement atteindre une distribution homogène chez l'adulte (Hoshiko et al., 2012; Arnoux et al., 2013). Hoshiko et ses collègues ont également démontré que l'infiltration des microglies à un moment précis dans les clusters d'axones dépendait d'une voie de communication particulière entre les neurones et la microglie : la voie Fractalkine, via le récepteur CX3CR1 de la microglie (Hoshiko et al., 2012).

Dans l'hippocampe, la colonisation microgliale apparaît également en relation avec le développement neuronal. Les premières microglies améboïdes sont observables dès E14 au niveau de ce qui est encore le primordium de l'Hippocampe (Dalmau et al., 1997). Elles sont le plus souvent au contact de la membrane piale, des vaisseaux sanguins et de la région périventriculaire. Elles envahissent ensuite à E17 les régions neuropiles (fibreuse) et les régions en différenciation. Une forme vacuolaire phagocytaire est également présente dans le fornix en développement caractérisé par une forte apoptose neuronale. Les premières formes ramifiées primitives apparaissent à E19, notamment au niveau de la fissure hippocampique hautement vascularisée, et commencent à s'étendre vers le stratum radiatum de CA1. Le Gyrus Denté qui se développe plus tard reste peu pourvu de microglies avant la naissance.

A la naissance, les microglies encore améboïdes ou peu ramifiées sont observées dans presque toutes les sous-régions de l'Hippocampe (exceptée la couche pyramidale) mais sont bien moins nombreuses au niveau du Gyrus Denté qui se développe plus tardivement que le reste de la structure (Dalmau et al., 1998). De P0 à P6, la densité microgliale, qui est la plus importante au niveau de la fissure hippocampique et dans le stratum lacunosum moleculare de CA1 et CA3 ne varie que très peu. C'est à partir de la 2^{ème} semaine postnatale qu'elle va significativement augmenter. Les microglies se dispersent alors dans toutes les sous-

régions, perdent leur proximité avec le système vasculaire et se ramifient de plus en plus. L'organisation spatiale des microglies et leur maturation semblent suivre les mêmes gradients de développement que l'Hippocampe : d'une part le gradient temporo-septal, d'autre part le développement de la corne d'Ammon avant celui du Gyrus Denté. L'organisation et la maturation microgliales semblent également être souvent liées au développement des fibres afférentes. L'augmentation de la densité et la maturation des microglies dans le lacunosum moleculare à partir de P9 correspond notamment à la mise en place des fibres perforantes et à la synaptogenèse. De même en CA3, les microglies colonisent le stratum lucidum lorsque les terminaisons des fibres mossues issues du Gyrus Denté viennent former leurs connections. Finalement, dans l'ensemble de l'Hippocampe la morphologie des microglies devient mature à partir de P15 et la distribution à P18 semble similaire à celle trouvée chez l'adulte.

Les observations faites par Dalmau et al., bien que purement qualitatives, peignent une image précise de la colonisation microgliale de l'Hippocampe au cours du développement postnatal, et soulignent une relation entre la microglie et les neurones. Plus récemment, l'augmentation de la densité microgliale au cours de la deuxième semaine postnatale a été confirmée par une analyse cette fois quantitative dans le stratum radiatum de CA1 de P1 à P28 (Paolicelli et al., 2011). Après la fin de la seconde semaine postnatale, la densité microgliale de l'Hippocampe diminue jusqu'à atteindre un niveau similaire à celui observé chez l'adulte (Paolicelli et al., 2011; Delpech et al., 2016). Comme au niveau des clusters d'axones du cortex somato-sensoriel associé aux vibrisses, la colonisation microgliale de l'Hippocampe dépend de la voie de communication Fractalkine entre les neurones et la microglie (Paolicelli et al., 2011; Hoshiko et al., 2012). Ceci suggère le rôle de la signalisation neuronale dans la colonisation microgliale.

Afin de pousser plus loin l'étude des mécanismes mis en jeu au cours de cette colonisation, tout en se libérant des limites imposées par les modèles mammifères, de nombreuses recherches sont réalisées sur le zebrafish, ou poisson zèbre. Chez ce poisson, les microglies sont également issues de précurseurs extraembryonnaires produits au niveau des îlots sanguins rostraux, équivalents du sac embryonnaire (Herbomel et al., 1999, 2001) et ce modèle a pour avantage de permettre facilement des manipulations génétiques ainsi que l'imagerie in vivo et en temps réel des microglies. Récemment, une étude a observé que l'entrée des précurseurs microgliaux dans le tectum optique du mésencéphale est temporellement et spatialement corrélée avec l'apoptose neuronale dans cette région (Xu et al., 2016). De plus, les auteurs ont démontré que l'inhibition de l'apoptose par manipulation génétique bloque temporairement cette colonisation et que celle-ci dépend de la sécrétion d'un phospholipide par les cellules apoptotiques, le lysophosphatidylcholine (LPC). Une seconde étude montre également que l'apoptose neuronale contribue à la mise en place de la population microgliale en promouvant l'invasion et la prolifération locale par la mise

en jeu de la voie de signalisation purinergique (Casano et al., 2016).

Chez les mammifères, les données sont quelque peu différentes. En effet, chez la souris et chez l'Homme, la colonisation des cellules microgliales semble orchestrée par une population des progéniteurs neuronaux, notamment au niveau de la zone sous-ventriculaire via la libération de chimiokine Cxcl12, alors que la mort cellulaire semble plutôt induire leur prolifération (Arnò et al., 2014). De même, une étude récente menée chez la souris suggère que la migration microgliale est indépendante de l'apoptose neuronale (Eyo et al., 2016). Ces résultats remettent en question la conservation des mécanismes orchestrant la migration microgliale entre les espèces, notamment entre les invertébrés et les mammifères.

A mesure qu'elle atteint sa destination finale, la microglie acquiert, comme l'avait déjà décrit del Rio-Hortega une morphologie de plus en plus complexe, passant de la forme améboïde des précurseurs à la forme très ramifiée de la microglie mature (Rio-Hortega, 1919; Wu et al., 1992; Dalmau et al., 1997, 1998; Schwarz et al., 2012; Arnoux et al., 2013; Perez-Pouchoulen et al., 2015). Tout comme la migration, la maturation de la microglie dans le système nerveux central en formation varie selon la région cérébrale et semblent associée au développement neuronal. La microglie évoluerait donc en fonction des signaux qu'elle perçoit dans son environnement. La morphologie des microglies immatures, processus peu développés, plus épais, avec un corps cellulaire plus large, est similaire à celle observée en conditions pathologiques, suggérant qu'elle pourrait remplir des fonctions similaires au cours du développement. De plus, la microglie immature présente des propriétés électrophysiologiques proches d'un état d'activation, comme dans l'Hippocampe en développement où des courants potassiques sortants et entrants caractéristiques de la microglie activée ont été observés (Pagani et al., 2015). La proportion de ces microglies est réduite chez la souris dépourvue du récepteur microglial CX3CR1. Des courants potassiques à rectification retardée sont également observés au niveau du cortex somato-sensoriel au cours du développement (Arnoux et al., 2013). La proportion de microglies exprimant ces courants potassiques augmente transitoirement après 5 jours postnataux, lorsque les microglies colonisent les structures en tonneaux du cortex où se forment les synapses (Hoshiko et al., 2012). De plus, ces courants à rectification retardée sont déterminés par l'expression de la sous-unité Kv1.3 des canaux potassiques dépendants du voltage, typique également de l'état d'activation de la microglie.

Différentes études ont montré que la maturation microgliale s'accompagne en effet de changements importants de l'expression génique. Ainsi, alors que les microglies primitives sont associées avec l'expression de gènes impliqués dans le cycle et la différenciation cellulaire, comme *Mcm5* and *Dab2*, les gènes impliqués dans le développement neuronal, comme *Csf1* ou *Cxcr2*, sont majoritairement exprimés quelques jours avant la naissance et diminuent chez l'adulte (Matcovitch-Natan et al., 2016). Une étude menée *ex vivo* à partir d'Hippocampe de souris a montré que plus tard dans le développement (entre 14 et 28 jours

postnataux) la maturation s'accompagne de l'augmentation des gènes impliqués dans l'inflammation, la migration cellulaire et la présentation d'antigène (Delpech et al., 2016). De plus, la maturation génétique et morphologique peut être perturbée et la densité microgliale à 14 jours postnataux augmentée par un protocole de stress.

De nombreuses données suggèrent qu'une altération de la fonction microgliale au cours de cette période développementale, notamment par une stimulation du système immunitaire, a un impact à long terme sur les fonctions cérébrales. Par exemple, l'infection de rats nouveaux-nés avec *Escherichia Coli*, suivi chez le sujet une fois adulte d'une atteinte immunitaire avec du LPS provoque une augmentation de la réactivité microgliale ainsi qu'une altération de la mémoire (Bilbo et al., 2005). Dans ce contexte, l'expression de BDNF est diminuée alors que celle d'IL-1 β est fortement augmentée, et l'inhibition de la caspase-1 qui empêche la synthèse d'IL-1 β atténue les effets sur la mémoire (Bilbo et al., 2005, 2008). De la même façon, une atteinte immunitaire pendant la gestation de la souris ou d'un primate non-humain induit l'apparition de symptômes liés à l'autisme, comme des changements de vocalisations, des interactions sociales perturbées ou des comportements répétitifs augmentés (Bauman et al., 2014; Machado et al., 2015; Malkova et al., 2012). L'activation des cellules microgliales par injection de LPS dans l'Hippocampe de rats âgés de 7 jours cause des perturbations comportementales chez les rats adultes caractéristiques de la schizophrénie (Zhu et al., 2014). De même, une atteinte immunitaire prénatale, suivie d'un stress autour de la puberté, induit chez la souris adulte des anomalies comportementales comme une synchronisation sensorimotrice diminuée (évaluée par le test d'inhibition par pré pulsation (PPI) ou l'hypersensibilité aux psychotropes (Giovanoli et al., 2013). De plus, la manipulation de la fonction microgliale par la minocycline empêcherait la masculinisation du cerveau et les comportements sexuels associés (Lenz et al., 2013).

L'ensemble de ces études montrent que la perturbation de la microglie au cours du développement, peut entraîner à long terme des comportements anormaux voire caractéristiques de maladies neuropsychiatriques. Ainsi, en plus de se développer elle-même en fonction de son environnement, la microglie est capable de lui répondre et de jouer à son tour un rôle dans la mise en place correcte des réseaux neuronaux.

c. Les fonctions de la microglie au cours du développement

La colonisation du système nerveux central par les microglies a lieu avant la différenciation des autres types cellulaires (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009), ce qui place la microglie au bon endroit et au bon moment pour jouer un rôle dans leur développement. En plus d'être impliquée dans la mise en place du système vasculaire cérébral (Arnold and Betsholtz, 2013), il est aujourd'hui admis que la microglie joue un rôle

important dans la mise en place des cellules qui l'entourent, notamment dans celle des neurones qu'elle va influencer à différentes étapes de leur développement.

Phagocytose et apoptose

La mort cellulaire programmée (MCP) constitue une véritable étape du développement cérébral et permet l'affinage des neurones qui seront conservés et qui formeront les circuits neuronaux fonctionnels (de la Rosa & de Pablo, 2000). La microglie est connue depuis longtemps pour réaliser la phagocytose des neurones apoptotiques associés à la MCP (Ferrer et al., 1990; Marín-Teva et al., 1999). Aujourd'hui, de nombreux éléments attestent d'un rôle plus actif dans l'initiation de cette mort cellulaire. D'abord *in vitro*, la mort cellulaire programmée est réduite lorsque la microglie est absente (Frade and Barde, 1998; Marín-Teva et al., 2004; Sedel et al., 2004). A l'inverse, elle augmente avec l'ajout de microglies et dépend de différents facteurs comme le facteur de croissance des nerfs (NGF, *Nerve Growth Factor*) microglial au niveau de la rétine de poussin, les ions superoxydes au niveau des cellules de Purkinje du cervelet ou encore le facteur de nécrose tumorale TNF α (Tumor Necrosis Factor) impliqué dans l'apoptose des motoneurones de la moelle épinière.

In vivo, la régulation microgliale de la mort cellulaire programmée a été montrée chez l'adulte au niveau de sites de neurogenèse (Sierra et al., 2010). Au cours du développement, la microglie phagocyte les progéniteurs neuronaux en excès (NPCs) dans le cortex cérébral de macaque et de rat (Cunningham et al., 2013). Lorsqu'elle est pharmacologiquement inactivée avec un traitement antibiotique (minocycline ou doxycycline) ou déplétée par l'utilisation du clodronate, le nombre de précurseurs neuronaux augmente. De plus, le traitement *in utero* d'embryons de rat avec du LPS, pour augmenter l'état inflammatoire des microglies, induit la diminution du nombre de précurseurs dans le cortex. Dans l'Hippocampe en développement (période périnatale), les neurones en apoptose sont contactés par les microglies exprimant l'intégrine CD11b et l'immunorécepteur DAP12 (Wakselman et al., 2008). Ces voies de signalisation immunitaires contrôlent la production d'ions superoxydes par la microglie induisant ainsi l'apoptose neuronale. L'ensemble de ces données chez les vertébrés démontre que la microglie, en plus de phagocyter les débris cellulaires produits au cours du développement, induit activement le phénomène de mort cellulaire programmée des neurones.

D'autres voies de signalisation impliquées dans la machinerie phagocytaire de la microglie ont été mises en évidence chez un modèle d'invertébré, notamment les récepteurs à la phosphatidylsérine Bal1 et Tim-4. Cependant, la microglie ne semble pas jouer de rôle actif dans l'induction de la mort cellulaire chez ce modèle invertébré et remet donc en question la conservation du mécanisme à travers les espèces (Mazaheri et al., 2014).

Neurogenèse et survie neuronale

Les différents facteurs libérés par la microglie sont également critiques pour la survie, la prolifération et la maturation des précurseurs neuronaux dans le cerveau en développement. Par exemple, l'addition de milieu de culture de microglie sur des cultures de neurones augmente la prolifération des précurseurs et améliore la survie et la maturation neuronale (Nagata et al., 1993; Chamak et al., 1994). De même, la prolifération de précurseurs isolés à partir d'embryon de souris est diminuée en l'absence de microglies (pu.1 ko). Cette diminution est atténuée par l'ajout de nouvelles microglies (Antony et al., 2011). Ces données suggèrent l'action positive de la microglie sur la neurogenèse in vitro. Paradoxalement, une autre étude a montré que des précurseurs isolés à partir de cerveaux de rats âgés de 3 mois et cultivés avec différentes concentrations de microglies, présentent une corrélation inverse entre la survie et le nombre de microglies (Gebara et al., 2013).

Ces différences pourraient traduire une spécialisation régionale, une hétérogénéité de la population microgliale ou une limitation expérimentale dues aux conditions de culture.

In vivo, l'absence des microglies augmente le nombre de neurones apoptotiques présents dans la couche V du cortex en développement (Ueno et al., 2013). L'inactivation pharmacologique des microglies ou l'altération de leur fonctionnement (par knock-out du récepteur CX3CR1) produit le même effet. Le taux de phagocytose étant maintenu dans ces conditions, l'augmentation de l'apoptose peut être attribuée à une diminution de la survie neuronale, corrélée à la diminution du facteur IGF-1 (insulin-like growth factor-1). Dans une autre étude, la même inactivation pharmacologique par la minocycline chez des rats induit une diminution du nombre de progéniteurs en prolifération au niveau de la zone sous-ventriculaire de l'Hippocampe (Shigemoto-Mogami et al., 2014). Des essais complémentaires in vitro suggèrent l'implication de cytokines microgliales (IL-1b, interféron gamma, IL-6) dans l'induction de la neurogenèse.

L'ensemble de ces données montre que la microglie est impliquée d'une part dans la mort cellulaire d'autre part, dans le support trophique des neurones. Cette dichotomie pourrait être liée à une différenciation régionale, la microglie jouant un rôle différent selon les informations qu'elle reçoit, ou encore à l'existence de différentes populations de microglies, remplissant différentes fonctions au cours du développement.

Développement axonal

Les microglies peuvent favoriser la croissance et la mise en place des axones neuronaux. En effet, leur absence, ainsi que leur activation ou l'altération de leur fonctionnement (KO DAP12) induit la réduction de la fasciculation des axones au niveau du corps calleux d'embryons de souris, c'est-à-dire de leur groupement en faisceaux de plusieurs axones, ainsi qu'une diminution de l'expression des gènes liés à la neuritogenèse (Pont-Lezica et al., 2014).

Cependant, les microglies semblent encore un fois présenter une dualité dans le rôle qu'elle joue sur le développement axonal. En effet, des travaux initiaux avaient déjà montré des débris d'axones ingérés par les microglies au niveau du corps calleux de chaton (Berbel and Innocenti, 1988). Au niveau du striatum d'embryon de souris, la microglie é été montrée contenant des débris d'axones dopaminergiques. Cette ingestion est empêchée lorsque les microglies sont absentes (par délétion pharmacologique ou génétique) ou lorsque leur communication avec les neurones est altérée (CX3CR1 KO). La croissance de ces axones dopaminergiques est par conséquent augmentée et mène à une erreur de localisation plus tard dans le développement (Squarzoni et al., 2014). Ces études montrent que, très tôt dans le développement, la microglie joue un rôle de régulateur de la croissance des prolongements axonaux, parfois en la favoriser, parfois en l'empêchant, et participent donc au modelage des réseaux.

Synaptogenèse et remodelage synaptique

Ce modelage se joue également à un niveau plus fin de la mise en place des réseaux : au niveau des connections synaptiques. Au cours du développement, les synapses traversent une phase de sélection, où les moins actives sont supprimées, alors que les plus actives sont maintenues et renforcées (Katz and Shatz, 1996; Hua and Smith, 2004). Parce qu'elles expriment un grand nombre de neurotransmetteurs (Pocock and Kettenmann, 2007), les microglies sont, comme le démontrent les études de la dynamique des processus, des senseurs dynamiques de l'activité neuronale (Davalos et al., 2005; Dissing-Olesen et al., 2014; Li et al., 2012; Nimmerjahn et al., 2005; Tremblay et al., 2010). Ainsi, la microglie est capable de modifier la fréquence et la durée des contacts qu'elle établit entre ses processus et les structures synaptiques en fonction de changement d'activité ainsi que la phagocytose qui en découle (Tremblay et al., 2010; Wake et al., 2009).

Le système rétinogéniculé constitue un modèle classique dans l'étude du remodelage synaptique développemental dépendant de l'activité et a permis de mettre en évidence le rôle qu'y joue la microglie. Au cours de ce remodelage, la microglie élimine les éléments présynaptiques immatures les moins actifs par phagocytose et de façon dépendante de la voie de signalisation du complément C3 et de son récepteur CR3 (Schafer et al., 2012). De plus, le blocage pharmacologique ou génétique de cette phagocytose médiée par le complément induit l'augmentation du nombre de synapses ainsi qu'une connectivité inappropriée à long terme (Stevens et al., 2007; Schafer et al., 2012; Bialas and Stevens, 2013). Ces études suggèrent un modèle selon lequel les protéines du complément (C1q, C3) marquent les synapses les moins actives pour signaler aux microglies via le récepteur au complément 3 (CR3) d'initier la phagocytose des éléments marqués. Ce modèle est supporté par des données in vivo qui montrent la localisation des protéines C1q et C3 au niveau des compartiments synaptiques (Stevens et al., 2007) et in vitro qui montrent que la microglie phagocyte des neurites marqués par C1q d'une manière dépendant de CR3 (Linnartz et al., 2012). La régulation de

l'expression des protéines du complément à la synapse par l'activité neuronale n'est cependant pas encore démontrée.

Ce phénomène de sélection et de remodelage synaptique a également été mis en évidence au niveau de l'Hippocampe de souris où la microglie a été montrée phagocytant des éléments post-synaptiques (Paolicelli et al., 2011). Lorsque la fonction microgliale est altérée par la délétion du récepteur CX3CR1, la phagocytose est diminuée, le nombre de synapses à la fin de la deuxième semaine postnatale est augmenté et associé à l'enregistrement d'une activité synaptique plus immature. Le nombre réduit de microglies dans ce modèle suggère qu'elle n'est pas présente au bon endroit et au bon moment pour phagocyter les éléments synaptiques immatures et ainsi participer correctement au remodelage du réseau. Récemment, il a été montré que le pruning microglial des synapses dépendrait du processus d'autophagie de la microglie (Kim et al., 2016). Ainsi, la délétion du gène *atg7*, nécessaire à l'autophagie, induit à la fin de la deuxième semaine postnatale l'augmentation du nombre d'épines dendritiques et de synapses. Adultes, les souris présentent un déficit de connectivité des régions cérébrales ainsi que des symptômes de type autistique similaires à ceux observés suite à la délétion du récepteur CX3CR1 (Kim et al., 2016; Zhan et al., 2014). Une étude très récente a montré qu'en plus d'éliminer les synapses surnuméraires au cours du développement, la microglie pourrait initier la formation de nouvelles synapses (Miyamoto et al., 2016). Les auteurs ont démontré par l'imagerie multiphotonique in vivo des neurones du cortex somatosensoriel en développement, que le contact direct entre processus microglial et dendrites induit la formation de nouveaux filopodes. Cette formation est précédée par une réponse calcique localisée au niveau du contact microglie-dendrite et par l'accumulation d'actine. L'inactivation de la microglie par la minocycline réduit la formation de ces filopodes. L'ablation totale des microglies diminue la densité des épines, le nombre de synapses excitatrices fonctionnelles ainsi que la connectivité des neurones corticaux. Ces dernières données confirment le rôle de la microglie dans la mise en place des connections synaptiques et proposent un nouveau mécanisme d'action.

Maturation synaptique

Au cours du développement, les synapses se mettent en place physiquement puis fonctionnellement avec le recrutement de récepteurs aux neurotransmetteurs. La composition de ces récepteurs évolue et confère à la synapse des propriétés électrophysiologiques de plus en plus matures et semblables à l'activité chez l'adulte. Des travaux initiaux sur tranches aigues d'Hippocampe de souris ont montré que l'altération fonctionnelle de la microglie, par la mutation de DAP12, une protéine transmembranaire microgliale connue pour interagir avec d'autres récepteurs, induisait un défaut de maturation des synapses (Roumier et al., 2004). En effet, les neurones enregistrés présentent des propriétés électrophysiologiques et

pharmacologiques caractéristiques de synapses glutamatergiques immatures. Parmi ces marqueurs d'immaturité, les auteurs ont observé la faible teneur des récepteurs AMPA à la synapse en sous-unité GluA2 ainsi que la sensibilité élevée à l'antagoniste ifenprodil traduisant la composition immature des récepteurs glutamatergiques NMDA et donc le switch retardé des sous-unité GluN2B vers GluN2A de ces récepteurs. L'altération fonctionnelle de la microglie par délétion du récepteur CX3CR1 induit des défauts de maturation similaires au niveau des synapses thalamocorticales du cortex somatosensoriel : diminution du ratio des récepteurs AMPA par rapport aux récepteurs NMDA et présence persistante de la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA (Hoshiko et al., 2012). D'autres indices pointant vers un défaut de la maturation synaptique ont été observés suite à la délétion du récepteur CX3CR1, au niveau de l'Hippocampe (en CA1), comme la diminution de l'effet de la tétrodontoxine sur l'amplitude des événements postsynaptiques, censé refléter l'augmentation de la connectivité et de la redondance des afférences, ou encore l'augmentation de la dépression synaptique à long terme, une forme de plasticité immature.

La première hypothèse pouvant expliquer ces retards de maturation repose sur un défaut du phénomène de « pruning » des synapses immatures (Paolicelli et al., 2011). Fonctionnellement altérée, la microglie ne serait plus capable de contribuer à la sélection des synapses présentant une signature électrophysiologique mature. La seconde hypothèse serait une altération de la libération des molécules de signalisation microgliales impliquées dans la modulation de l'expression et de la fonction des récepteurs glutamatergiques comme l'interleukine-1 β , le facteur de nécrose tumorale TNF- α ou le facteur BDNF (Beattie et al., 2002; Chao, 2003; Zhang et al., 2010).

Ainsi la microglie semble contribuer à la maturation synaptique, que cela soit en favorisant la création de nouvelles synapses, au contraire en supprimant les synapses immatures, ou encore en agissant directement sur l'expression des récepteurs neuronaux. L'action précise de la microglie reste encore à confirmer d'une part, et à préciser d'autre part. De plus, l'apparente contradiction de ces observations pourrait refléter l'existence de différentes populations microgliales, différemment impliquées dans le développement neuronal et synaptique selon les conditions et les régions cérébrales, ou la coexistence de ces fonctions complémentaires.

Développement des neurones GABAergiques

Toutes ces données démontrent le rôle important de la microglie au cours du développement des réseaux neuronaux et plus particulièrement dans celui des connections glutamatergiques. Cependant, deux articles parus en 2014 suggèrent qu'elle pourrait également être impliquée dans celui des connections GABAergiques. Ces connections sont les premières à se mettre en place au cours du développement, notamment dans l'Hippocampe comme nous l'avons vu dans le premier chapitre. L'acide γ -aminobutyrique,

GABA, constitue ainsi le principal neurotransmetteur au cours de cette période. Dans l'hypothèse où la microglie participerait à la mise en place et la maturation de ces connections, comme elle le fait pour les synapses glutamatergiques, une altération de la fonction microgliale au cours du développement aurait un impact majeur sur le signal GABAergique et sur la connectivité des réseaux.

Zhan et al ont observé suite à l'altération de la fonction microgliale par délétion du récepteur CX3CR1 que la fréquence des événements synaptiques GABAergiques (mIPSCs) dans l'Hippocampe était diminuée à la fin de la seconde semaine postnatale et non augmentée comme celles des événements Glutamatergiques. Cette différence démontre que les synapses excitatrices et inhibitrices sont différemment affectées par la délétion de CX3CR1 et par la microglie. Les synapses inhibitrices ne semblent donc pas soumises au phénomène de pruning par les microglies, ce qui pourrait s'expliquer par la morphologie très différente de ces synapses comparées aux synapses excitatrices. En effet, les synapses GABAergiques n'étant pas situées au niveau d'épines dendritiques, la microglie pourrait être incapable de sectionner et ingérer ces synapses sans atteinte à l'intégrité du neurone. La microglie pourrait influencer le développement du signal GABAergique, non pas par le remodelage synaptique, mais par l'apoptose, la neurogenèse ou la maturation axonale et synaptique.

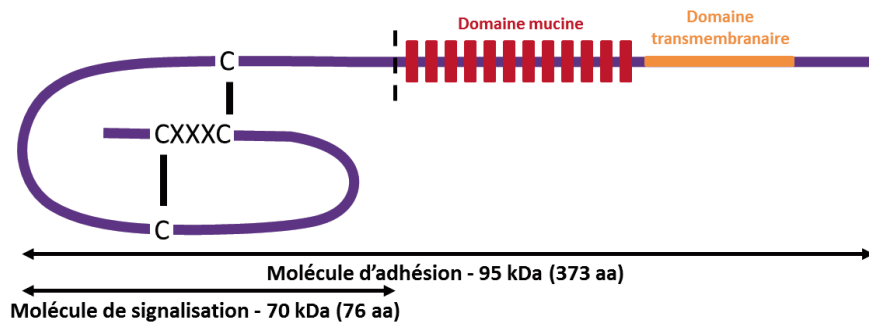
Cette hypothèse est soutenue par l'étude de Squarzoni et al. qui montre qu'une altération microgliale a des conséquences sur la localisation des interneurons (Squarzoni et al., 2014). En effet, lorsque les microglies sont absentes (par délétion pharmacologique ou génétique), les interneurons exprimant Lhx6 entrent prématurément dans la couche corticale et sont moins nombreux au niveau de la couche V du cortex qu'ils ne le sont chez les animaux contrôles. Les mêmes altérations sont induites par l'activation des microglies par injections successives de LPS. Le positionnement imprécis de ces interneurons au stade embryonnaire persiste jusque 20 jours postnataux. Ceci implique que la microglie joue dans des conditions physiologiques un rôle dans la localisation précise des interneurons au cours du développement cérébral. Lorsque la microglie est plus subtilement altérée par la délétion des récepteurs CX3CR1 ou DAP12, la localisation des interneurons est également affectée. Cet effet pourrait être en partie dû à la mauvaise localisation des microglies dépourvues du récepteur à la Fractalkine.

Il est intéressant de noter que ces altérations touchent particulièrement une sous-population d'interneurons, les « fast-spiking » qui expriment au stade embryonnaire le facteur de transcription Lhx6 puis plus tard la parvalbumine, mais sont négatifs aux marqueurs d'autres populations d'interneurons, comme la reeline ou la somatostatine (Squarzoni et al., 2014). Cette exclusivité met en évidence la précision de la microglie dans le rôle qu'elle peut remplir au cours du développement des neurones.

III. Le rôle particulier de la Fractalkine

Décrite pour la première fois en 1997 (Schall, 1997; Bazan et al., 1997), la Fractalkine est la seule molécule appartenant à la sous-famille δ des chimiokines. Ses quatre résidus Cystéine reliés par des ponts dissulfures forment le domaine chimiokine. La fractalkine doit sa nouvelle nomenclature CX3CL1 aux trois résidus qui séparent les deux premières cystéines.

Elle existe sous deux formes : membranaire ou soluble. La première est constituée du domaine chimiokine à l'extrémité N-terminale, d'un domaine mucine et d'un domaine transmembranaire hydrophobe en C-terminale permettant l'ancrage dans la membrane neuronale. La seconde est une forme tronquée de la molécule et ne comprend que le domaine chimiokine libéré dans le milieu extracellulaire après clivage par la cystéine-protéase lysosomal, cathepsin S, ou par les enzymes de la famille ADAM. Une fois clivée, la Fractalkine demeure sous forme de monomère et joue le rôle de molécule de signalisation et d'attractant.



Représentation schématique de la Fractalkine avec son domaine chimiokine correspondant à la molécule de signalisation, son domaine mucine et son domaine transmembranaire permettant son ancrage à la membrane des neurones.

Bien que l'ARN messager de la Fractalkine soit significativement présent chez le rat au niveau du cœur, des poumons, des reins et des glandes surrénales, sa source principale est le système nerveux central, notamment au niveau du cortex, du bulbe olfactif, du thalamus, du putamen caudé et de l'Hippocampe (Harrison et al., 1998). L'expression de la Fractalkine par les neurones est constitutive et peut être augmentée par différents stimulateurs comme les cytokines pro-inflammatoires comme TNF- α (Chandrasekar et al., 2003). En culture ces cytokines (TNF- α , IL-1 β) peuvent également forcer l'expression de la Fractalkine par les astrocytes (Maciejewski-Lenoir et al., 1999). Cette réponse aux signaux pro-inflammatoires suggère une surexpression de la Fractalkine en conditions pathologiques pouvant par conséquent activer la signalisation « OFF ».

CX₃CR₁ est quant à lui un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine G et exprimé de manière ubiquitaire par les monocytes ainsi que certaines populations de cellules du système immunitaire comme les « Natural Killer », NK, ou les cellules dendritiques et lymphocytes T (Imai et al., 1997;

Harrison et al., 1998; Jung et al., 2000). Certaines études réalisées *in vitro*, ont observé l'expression du récepteur par les neurones (Meucci et al., 1998; Hatori et al., 2002; Heinisch and Kirby, 2009) et par les astrocytes (Maciejewski-Lenoir et al., 1999). Cependant, dans le système nerveux central sain, ce récepteur est considéré comme spécifiquement exprimé par le macrophage résident, la microglie, et reconnaît exclusivement le domaine chimiokine de la fractalkine (Jung et al., 2000 ; Mizutani et al., 2012). De par son couplage à l'extrémité intracellulaire C-terminale à une protéine Gi, le récepteur CX3CR1 inhibe la production d'AMP cyclique et met en jeu différentes voies de signalisation intracellulaire menant à l'activation de facteurs de transcriptions comme NF-KB ou CREB (Sheridan and Murphy, 2013).

Malgré son effet pro-migratoire en culture (Maciejewski-Lenoir et al., 1999), la voie de signalisation Fractalkine/CX3CR1 est souvent considérée comme une voie de signalisation « OFF » de la microglie. Ainsi, *in vitro* la Fractalkine prévient l'apoptose des microglies et améliore la survie neuronale (Boehme et al., 2000). De même, l'application de Fractalkine *in vivo* sur un modèle de la maladie de Parkinson diminue la réactivité microgliale et la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL1 β), réduit la mort neuronale et améliore les symptômes de la maladie (Morganti et al., 2012). La majorité des informations connues à ce jour sur le rôle de voie de signalisation Fractalkine/CX3CR1 ont été obtenues grâce au développement d'un modèle murin transgénique. Dans ce modèle créé en 2000 par Jung et al., le gène du fluorochrome GFP (Green Fluorescent Protein) remplace les 390 premières bases du second exon CX₃CR₁ codant pour l'extrémité N-terminale du récepteur, nécessaire pour l'interaction avec la Fractalkine. Selon le but recherché, la mutation peut être hétérozygote, les souris CX₃CR₁^{+/^{eGFP} possédant des microglies exprimant à la fois le récepteur CX₃CR₁ fonctionnel et la protéine fluorescente GFP, ou homozygote, privant alors totalement les souris CX₃CR₁^{eGFP/eGFP} du récepteur CX₃CR₁. Le déficit de la voie de signalisation chez ces souris semble avoir un effet controversé selon les conditions pathologiques. Alors que son absence est néfaste et neurotoxique dans certaines conditions pathologiques, telles que l'activation par le LPS ou des modèles de Parkinson et de Sclérose Latérale Amyotrophique (Cardona et al., 2006), elle a un effet bénéfique et neuroprotecteur dans d'autres contextes tels que la maladie d'Alzheimer (Lee et al., 2010).}

Nous avons également vu dans le paragraphe précédent, l'importance de la voie de signalisation Fractalkine/CX3CR1 au cours du développement cérébrale. Alors que son absence perturbe d'une part la maturation et la distribution spatio-temporelle de la microglie dans la période postnatale, et d'autre part le développement synaptique glutamatergique, la croissance axonale dopaminergique et le positionnement des interneurons corticaux au cours du développement (Paolicelli et al., 2011 ; Hoshiko et al., 2012 ; Squarzoni et al., 2014 ; Pagani et al., 2015), elle est également corrélée à des altérations comportementales chez l'adulte. Ainsi, les souris CX3CR1 KO adultes présentent des comportements classiques de l'autisme,

tels que la réduction des interactions sociales ou l'augmentation des comportements répétitifs (Zhan et al., 2014). Ces symptômes de type autistique sont en adéquation avec la connectivité réduite entre les régions cérébrales étudiée en IRM chez les souris CX3CR1 KO. Ces souris présentent également des défauts de mémoire dépendante de l'Hippocampe, mis en évidence par différents tests tels que le conditionnement par la peur, le rotarod (un cylindre en constante rotation que lequel les souris doivent apprendre à se maintenir) ou la piscine de Morris (Rogers et al., 2011). Les atteintes comportementales sont corrélées dans cette étude à une réduction de la neurogenèse adulte, une diminution de la plasticité synaptique et une augmentation de l'activation microgliale. Cependant, que les altérations observées chez l'adulte soient dues à un défaut purement développemental ou à un besoin continu de la communication Fractalkine en temps réel reste à déterminer.

PARTIE 2 – PROJET DE THESE

Chapitre 1 : Objectifs

La microglie constitue la population de macrophages résidents du système nerveux central. En tant que cellule immunitaire, son rôle est principalement connu en conditions pathologiques où elle assure la phagocytose des débris cellulaires et participe au phénomène d'inflammation. Cependant, de nombreuses études ont à ce jour mis en évidence son rôle actif en condition physiologique et plus particulièrement au cours du développement. Au cours de cette période, la microglie d'origine extraembryonnaire colonise progressivement le système nerveux central alors en formation et prend part à l'élimination des neurones apoptotiques issus de la mort cellulaire programmée. Sa distribution spatiotemporelle précise est alors influencée par sa communication privilégiée avec les neurones via la voie de signalisation Fractalkine/CX3CR1. En effet, l'étude de la distribution microgliale chez les souris CX3CR1^{eGFP/eGFP}, dépourvues du récepteur CX3CR1 à la Fractalkine (Jung et al., 2000), a montré un retard de la colonisation microgliale au niveau du cortex somato-sensoriel dans la première semaine postnatale à P6 (Hoshiko et al., 2012). Il en est de même dans le stratum radiatum de CA1 de l'Hippocampe, où la densité microgliale est réduite entre 8 et 28 jours postnataux (Paolicelli et al., 2011). Cette altération de la distribution microgliale dans la période postnatale est corrélée à un défaut de développement des synapses excitatrices glutamatergiques. Le nombre de synapses et la fréquence des événements glutamatergiques sont en effet augmentés chez ces souris en raison d'une réduction du phénomène de pruning par lequel les microglies participent à l'élimination des synapses inappropriées. La voie de signalisation Fractalkine/CX3CR1 est également impliquée dans la maturation fonctionnelle des synapses glutamatergiques dont elle influence la composition en récepteurs AMPAR et NMDAR ainsi que la transition des sous-unités GluN2B vers GluN2A des récepteurs NMDA (Hoshiko et al., 2012). En plus de ces altérations développementales observées au niveau du cortex et de l'Hippocampe, la délétion du récepteur CX3CR1 induit chez l'adulte une connectivité réduite entre les régions cérébrales corrélée au développement de troubles comportementaux de type autistique (Zhan et al., 2014), ainsi qu'une atteinte de la mémoire dépendant de l'Hippocampe (Rogers et al., 2011).

Ces troubles autistiques sont généralement associés à une réduction de la connectivité cérébrale (Courchesne et al., 2005) et à un déséquilibre de la transmission synaptique excitatrice/inhibitrice (Rubenstein and Merzenich, 2003). Or, à l'inverse des synapses glutamatergiques, peu d'informations sont connues concernant le rôle de la microglie dans le développement des synapses GABAergiques pourtant principales responsables de la transmission neuronale au cours de la période postnatale. La délétion du récepteur CX3CR1 affecte cependant la localisation d'une sous-population d'interneurones corticaux dès le stade embryonnaire et semble diminuer la transmission GABAergique dans la région CA1 de l'Hippocampe à la fin de la deuxième semaine postnatale (Squarzoni et al., 2014 ; Zhan et al., 2014).

Au cours de la première semaine de développement postnatal, l'activité de l'Hippocampe encore immature se caractérise par une transmission synaptique excitatrice majoritairement GABAergique et une activité de réseau spécifique : les Giant Depolarizing Potentials (GDPs ; (Ben-Ari, 2002 ; Ben-Ari et al., 1989)). Ces GDPs correspondent à de larges événements de dépolarisation spontanée se propageant dans les neurones pyramidaux de CA3 en CA1. Ils sont générés dans une sous-population d'interneurones de CA3 assemblés en hub, par l'action dépolarisante du GABA (Bonifazi et al., 2009 ; Allene et al., 2012 ; Villette et al., 2016). Les GDPs disparaissent au cours de la seconde semaine postnatale, lorsque le GABA devient inhibiteur suite à l'augmentation du ratio des transporteurs au chlore KCC2/NKCC1 qui diminue la concentration intracellulaire en chlore et par conséquent l'effet du GABA (Ben-Ari, 2002). Différents modèles d'autisme présentent une altération de la fréquence à la fois des GDPs et des événements synaptiques GABAergiques (Pizzarelli and Cherubini, 2013 ; Hammer et al., 2015 ; Cellot et al., 2016).

L'ensemble de ces données désigne la première semaine postnatale comme une période critique dans le développement de l'Hippocampe et l'émergence de troubles comportementaux de type autistique, mais également schizophrénique. En effet, il a par exemple été montré que l'activation des cellules microgliales par injection de LPS dans l'Hippocampe de rats âgés de 7 jours cause des perturbations comportementales chez les rats adultes caractéristiques de la schizophrénie (Zhu et al., 2014).

Dans cette thèse, nous avons voulu déterminer les conséquences de la suppression de la voie de communication Fractalkine/CX3CR1 sur le développement postnatal de l'Hippocampe et sur l'émergence de troubles comportementaux schizophréniques.

Pour cela, les travaux menés chez la souris CX3CR1^{eGFP/eGFP} ont visé à répondre aux quatre questions spécifiques suivantes :

- 1) La densité microgliale est-elle réduite dans différentes régions de l'Hippocampe ?
- 2) L'activité synaptique, notamment GABAergique, est-elle modifiée ?
- 3) L'activité de réseau GDPs est-elle altérée ?
- 4) Les souris adultes présentent-elles des symptômes caractéristiques de la schizophrénie ?

Chapitre 2 : Plan expérimental et résultats principaux

Afin d'explorer le rôle de la microglie, et plus particulièrement celui de la voie de communication Fractalkine/CX3CR1, dans le développement des circuits neuronaux de l'Hippocampe, nous avons décidé de travailler sur le modèle de souris transgénique CX3CR1^{eGFP/eGFP}. Chez ces souris, le gène du fluorochrome GFP (Green Fluorescent Protein) remplace la séquence du gène CX₃CR₁ codant pour l'extrémité N-terminale du récepteur, nécessaire à l'interaction avec la Fractalkine. La voie de communication est ainsi supprimée de façon complète et constitutive. Le récepteur CX3CR1 étant spécifiquement exprimé par les microglies dans le système nerveux central, ce modèle constitue une approche expérimentale ciblée et pertinente. Le fond génétique black 6 de ces souris transgéniques étant connu pour les difficultés de reproduction, nous avons décidé d'importer une lignée de ces souris transférée sur un fond génétique plus simple à entretenir en animalerie, le fond 129. Ces souris permettent la production de portées constituées d'individus en nombre suffisant pour mener une étude développementale en réduisant le nombre de couples de souris.

Dans un premier temps, nous avons tenté de répondre aux trois premières questions de nos objectifs en comparant des souris transgéniques CX3CR1 KO obtenues par croisement [N4 CX3CR1^{eGFP/eGFP} x N4 CX3CR1^{eGFP/eGFP}] et des souris de type sauvage 129 obtenu par croisement [129S2/SvPasCrl x 129S2/SvPasCrl]. Les résultats préliminaires obtenus sont présentés et discutés dans le chapitre 1 de la partie résultats de cette thèse. Cependant, les différences observées, qui paraissaient à première vue intéressantes, sont vraisemblablement attribuables à des variations entre portées et entre fonds génétiques. En effet, les souris de type sauvage « 100 % » 129 ne constituaient pas un contrôle valide pour les souris CX3CR1^{eGFP/eGFP} de fond génétique mixte à 95 % 129 et 5 % black 6. Au regard de ces observations, une attention toute particulière doit être portée aux conditions exactes dans lesquelles sont menées les études comparatives, notamment au cours du développement où les phénomènes étudiés correspondent souvent à des fenêtres temporelles très restreintes.

L'ensemble des procédures expérimentales réalisées jusque-là a été reconduit chez des souris CX3CR1^{eGFP/eGFP} (KO), CX3CR1^{+/eGFP} (HE) et CX3CR1^{+/+} (WT) issues des mêmes portées obtenues par croisement de reproducteurs hétérozygotes [N6 CX3CR1^{+/eGFP} x N6 CX3CR1^{+/eGFP}]. Les animaux utilisés ont également été systématiquement pesés de manière à écarter des animaux éventuellement sous-développés.

Pour répondre aux quatre questions établies dans les objectifs, nous avons opté pour les stratégies expérimentales décrites ci-après :

1) La densité microgliale est-elle réduite dans différentes régions de l'Hippocampe ?

Pour étudier la distribution des microglies au cours du développement postnatal, et vérifier l'impact de la délétion CX3CR1 sur leur densité selon l'âge et les différentes sous-régions de l'Hippocampe, nous avons procédé au marquage immunohistochimique spécifique des cellules microgliales par un anticorps dirigé contre la molécule microgliale Iba1 (Ionized calcium-Binding Adaptator 1) sur des tranches d'Hippocampe de souris perfusées à différents âges postnatals. De manière à pouvoir étudier de larges régions hippocampiques, nous avons acquis les images de ces marquages en microscopie à épifluorescence sur des tranches entières de cerveaux coupés au niveau de l'Hippocampe dorsal grâce à un système de scanner de lames. Nous avons ensuite développé une méthode de comptage semi-automatisé des cellules, permettant la quantification de la densité dans les différentes sous-régions de l'Hippocampe : les strata oriens, pyramidale et radiatum de CA1 et CA3 ainsi que la fissure hippocampique.

Les résultats obtenus par cette approche quantitative montrent l'augmentation de la densité microgliale dans l'Hippocampe au cours du développement postnatal. De plus, l'absence du récepteur CX3CR1 réduit la densité microgliale dans la région CA3 à la fin de la première semaine postnatale.

2) L'activité synaptique, notamment GABAergique, est-elle modifiée ?

Afin de répondre à cette question, nous avons enregistré en patch clamp l'activité postsynaptique GABAergique dans les neurones pyramidaux de CA3 à P8-9 alors que la densité microgliale y est réduite. Afin d'isoler les IPSCs, nous avons bloqué les récepteurs AMPA et NMDA par l'application de NBQX et de DAP5.

Nous avons par cette approche électrophysiologique montré que la délétion de la voie de communication Fractalkine/CX3CR1 affecte l'activité synaptique spécifiquement GABAergique à la fin de la première semaine postnatale. Nous observons en particulier une proportion plus importante d'évènements de grande amplitude chez les neurones de souris CX3CR1 KO.

3) L'activité de réseau GDPs est-elle altérée ?

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé la même approche électrophysiologique de patch-clamp sur des neurones pyramidaux de la région CA3 où l'activité de réseau GDPs est générée au cours de la première semaine postnatale par une sous-population d'interneurones en hub. La fréquence des GDPs a été évaluée dans la même fenêtre temporelle où la densité microgliale est réduite chez les souris CX3CR1 KO.

Comme chez les souris WT, les GDPs disparaissent au cours de la deuxième semaine postnatale chez les souris KO. Cependant, leur fréquence est réduite à P7 comparé aux WT.

4) Les souris adultes présentent-elles des symptômes caractéristiques de la schizophrénie ?

Pour répondre à cette dernière question, nous avons soumis des souris mâles $CX3CR1^{eGFP/eGFP}$ (KO), $CX3CR1^{+/eGFP}$ (HE) et $CX3CR1^{+/+}$ (WT) à un test comportemental classique permettant de mettre en évidence des symptômes de la schizophrénie : le test de PPI (pre-pulse inhibition). Ce test repose sur le comportement naturel du rongeur à sursauter lorsqu'il est soumis à un stimulus sonore de forte intensité. Lorsque ce stimulus est précédé d'un stimulus de faible intensité, la réaction du rongeur diminue. Chez les patients schizophrènes comme chez les modèles animaux de schizophrénie, cette inhibition par le pré-stimulus est réduite.

Cependant, les résultats obtenus ne montrent aucune différence entre les génotypes.

PARTIE 3 – RESULTATS

Chapitre 1 : Mise en place technique et résultats préliminaires

I. Méthodes

Animaux

Toutes les expériences ont été réalisées sur des souris de 0 à 15 jours postnataux (P0 à P15), mâles et femelles. Toutes les procédures expérimentales ont suivi les directives du CNRS et de l'Université de Bordeaux sur l'utilisation et le bien-être des animaux de laboratoire. Les animaux de type sauvage sont issus de portées black 6 C57BL6J directement obtenues auprès de Charles Rivers, ou de portées 129 reproduite en animalerie spécialisée à partir de reproducteurs 129S2/SvPasCrl obtenus auprès de Charles Rivers. Les souris génétiquement modifiées CX3CR1eGFP/eGFP (Jung et al., 2000) ont été dérivées du fond génétique black 6 vers le fond 129 par croisements répétés (>N4) au CDTA d'Orléans ((Département de Cryopréservation, Distribution, Typage et Archivage animal). Les souris homozygotes CX3CR1eGFP/eGFP et hétérozygotes CX3CR1+/eGFP sont issues de portées distinctes respectivement obtenues par les croisements [N4 CX3CR1eGFP/eGFP x N4 CX3CR1eGFP/eGFP] et [N4 CX3CR1eGFP/eGFP x 129S2/SvPasCrl wild type]. La mise en place des méthodes de quantification de la densité et de la morphologie microgliale dans l'Hippocampe au cours des deux premières semaines de développement postnatal, a été réalisée sur des souris black 6 à P0, P3, P6, P9, P12 et P15. L'effet spécifique de la délétion du récepteur CX3CR1 sur la densité a été évalué en comparant des souris 129 sauvages et CX3CR1eGFP/eGFP ou CX3CR1+/eGFP, aux mêmes âges.

Immunohistochimie

Les souris de 3 à 15 jours postnataux (P3 à P15) ont été anesthésiées par overdose de Pentobarbital (50 à 75 µL/animal) puis perfusées en intracardiaque avec une solution saline (NaCl 0.9 %) suivie d'une solution de paraformaldéhyde diluée à 4 % dans une solution saline tampon phosphate (PBS). Les souris nouveau-nés (P0) ont été directement sacrifiées par décapitation. Les cerveaux prélevés ont ensuite été postfixés dans le même fixateur pendant 4 à 12h à 4°C, puis rincé avec du PBS et conservé à 4°C. Les coupes coronales d'une épaisseur de 50 µm ont été préparées avec un vibratome VT 1000 de chez Leica. Les coupes ont été collectées flottantes dans du PBS. Une solution d'azide de sodium, diluée à 0.03 % dans du PBS, a été utilisée pour conserver les coupes pour plus de deux semaines). Afin d'éviter la variabilité entre l'Hippocampe dorsal et ventral, seules les coupes dorsales ont été utilisées pour l'immunohistochimie. Les coupes ont été incubées dans une solution de saturation (4% BSA et 1% Triton dilués dans du PBS) pendant 2h à température ambiante. Les coupes ont ensuite été incubées 36 heures à 4°C avec l'anticorps primaire dirigé contre le marqueur microglial Iba1 (1:1000 ; Ac polyclonale de lapin ; Wako) dilué dans une solution de PBS

2% de BSA et 0.2% de Triton, puis rincées trois fois 5 minutes dans du PBS avant d'être incubées 2h à température ambiante avec l'anticorps secondaire Alexa 568 (IgG anti lapin ; 1:500 ; Invitrogen) puis à nouveau rincées. Enfin, les coupes ont été montées avec du milieu de montage Vectashield H1200 avec DAPI (Vector lab).

Imagerie

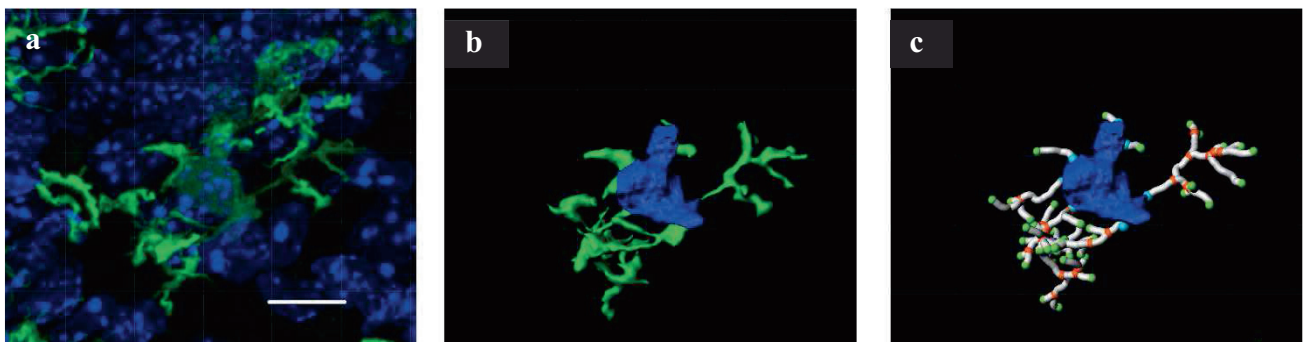
Les images de fluorescences pour la quantification de la densité ont été acquises sur un système de scanner de lame, le Nanozoomer (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) équipé d'un objectif 20x (ouverture numérique 0.75) et d'une lentille supplémentaire de 1.75x. Ce système permet l'acquisition automatique d'images de la surface totale de l'échantillon et offre donc une vision globale d'une section coronale de cerveau avec une résolution de 500 nm.

Les images utilisées pour la reconstruction morphologique des microglies ont été acquises sur un microscope confocal Leica DMI6000 TCS SP8 X équipé d'un objectif à huile 63x (NA 1.4), d'une diode laser 405 nm, d'un laser blanc 470-670nm et de détecteurs PMT (tubes photo-multiplificateurs).

Analyse quantitative de la densité microgliale

Les images de coupes entières acquises sur le Nanozoomer ont été recadrées de façon à isoler l'Hippocampe, converties en format TIFF sur le logiciel NDP.view2 Viewing (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japon), puis importées sur ImageJ pour l'analyse. La densité microgliale a été mesurée dans différentes régions de l'Hippocampe : le stratum oriens, la couche pyramidale et le stratum radiatum/moleculare de CA1 et CA3 ainsi qu'au niveau de la fissure de l'Hippocampe. Chaque région a été définie à partir du marquage des noyaux cellulaires par le DAPI. Les cellules positives au marqueur Iba1 ou exprimant constitutivement l'eGFP ont été comptées manuellement à l'aide d'un plugin sur ImageJ à P0, P3, P6, P9, P12 et P15 dans chaque région de quatre coupes d'Hippocampes par animal.

Analyse quantitative de la morphologie microgliale



Les images obtenues en microscopie confocale ont été importées dans le logiciel d'analyse 3D Imaris pour procéder à la reconstruction morphologique à partir du marquage Iba1. Des filtres gamma, puis médians, ont été successivement appliqués sur chaque image (a) avant la création d'un objet « surface » correspondant au corps cellulaire de la cellule (b, en bleu), d'un objet « surface » pour la cellule entière (b, vert et bleu) ainsi qu'un objet « filament » créé par la reconstruction semi-automatique des processus (c).

La reconstruction de ces objets a permis la mesure du volume des cellules entières, des corps cellulaires ou processus, l'évaluation de la sphéricité du corps cellulaire, le nombre de processus, leur longueur, leur profondeur (nombre d'embranchement maximum) et le nombre de point terminaux.

Préparation des coupes pour enregistrement électrophysiologique

Les coupes sagittales d'Hippocampe ont été préparées à partir de souris entre 0 et 10 jours postnataux. Les animaux ont été anesthésiés avec de l'isoflurane 5% pendant 60 à 90 secondes, puis sacrifiés. Les cerveaux ont été prélevés et disséqués en tranches de 350 μm d'épaisseur sur un vibratom (Leica VT 1000S). Les tranches ont été conservées pendant toute la procédure dans une solution d'ACSF contenant en mM : 124 NaCl, 3 KCl, 26 NaHCO_3 , 1.25 NaH_2PO_4 , 10 D-Glucose, 2 CaCl_2 and 1 MgCl_2 (295-305 mOsm). La solution était glacée et bullée en continu avec du carbogène (95% O_2 , 5% CO_2) pour maintenir un pH neutre. Les coupes ont ensuite été incubées dans une solution d'ACSF à 34 °C pendant 45 à 60 min puis maintenues à température ambiante. Pour l'enregistrement électrophysiologique, les coupes sont transférées dans une chambre d'enregistrement remplie d'ACSF à 30.5 ± 0.5 °C et perfusée à un débit de 3 mL/min.

Enregistrement électrophysiologique

Les électrodes, d'une résistance comprise entre 4.5 et 5.5 $\text{M}\Omega$, ont été préparées à partir de pipettes en borosilicate (GC150T-10, Harvard Apparatus) avec une étireuse verticale de micropipettes (PC-10, Narishige). La solution intracellulaire était composée en mM de : 130 KCl, 11 HEPES, 0.1 EGTA, 4 MgCl_2 , 4 Na-ATP, 0.3 Na-GTP et 10 Phosphocréatine (295 mOsm). Le pH a été ajusté à 7.3-7.4 avec du KOH. Les neurones pyramidaux de CA3 ont été enregistrés en patch-clamp configuration cellule entière en utilisant un microscope Nikon avec contraste interférentiel infrarouge et équipé d'un objectif 60x à immersion. Tous les enregistrements ont été réalisés avec un amplificateur EPC10 USB (HEKA Elektronik) et échantillonnés à 10 kHz.

Les neurones pyramidaux ont été identifiés selon leur localisation dans la couche pyramidale au niveau de CA3 et selon leurs propriétés électrophysiologiques. Des paliers de courants dépolarisants ont été appliqués pour mesurer le seuil de dépolarisation et l'amplitude des potentiels d'action (stimulation de 30 ms) ainsi que pour évaluer les propriétés d'accommodation (stimulation de 300 ms). L'activité spontanée a été

enregistrée en voltage-clamp à -70 mV. La résistance membranaire, la capacitance et la résistance d'accès ont été contrôlées durant toute la durée de l'expérimentation. Les cellules avec une résistance d'accès supérieure à 25 MΩ ont été éliminées.

L'activité de réseau – Pour examiner la fréquence des GDPs, l'activité spontanée a été enregistrée pendant 20 min à un potentiel de membrane fixé à -70 mV et les GDPs apparaissent dans ces conditions comme courants entrants.

Les courants entrants de longue durée ont été automatiquement détectés grâce à la fonction « détection d'évènements » du logiciel Clampfit (Molecular Devices) puis ont été identifiés comme GDPs selon deux critères incluant une amplitude minimale de 300 pA et une durée supérieure à 150 ms.

L'activité synaptique – L'activité GABAergique spontanée (sIPSCs) a été enregistrée pendant 5 min en présence de NBQX (10 μM) et de D-AP5 (50 μM) pour bloquer respectivement les récepteurs AMPA et NMDA. De la tétródotoxine (TTX, 1 μM) a ensuite été ajoutée aux NBQX et DAP5 pour supprimer les potentiels d'action, permettant ainsi l'enregistrement des évènements synaptiques miniatures (mIPSCs) pendant 5 min. L'activité excitatrice Glutamatergique spontanée (sEPSCs) a été enregistrée pendant 10 min en présence de Bicuculline (20 μM) pour bloquer les récepteurs GABA_A. La TTX a ensuite été ajouté à la Bicuculline pour isoler et enregistrer les mEPSCs pendant 10 min.

La détection et l'analyse des évènements spontanés et miniatures ont été effectuées sur un logiciel développé par M. Goillandeau (© M Goillandeau IMN / CNRS, Université de Bordeaux, Detection Mini version 8.0). Le principe de ce programme est fondé sur la création d'un « signal de détection », calculé d'après la différence entre le signal filtré et le signal basal. La détection des évènements s'appuie principalement sur un seuil de détection communément fixé à trois fois le 95^{ème} centile du signal analysé, correspondant au niveau de bruit moyen du signal.

Produits chimiques et pharmacologiques

BSA (Bovine Serum Albumin), Triton X-100, PBS 10X (phosphate buffer saline) et les différents composants chimiques utilisés dans les solutions ont été obtenues chez Sigma-Aldrich. Les traitements pharmacologiques utilisés en électrophysiologie : NBQX (2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo-quinoline-7-sulfonamide, 0373), D-AP5 (D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid, 0106), TTX (Tetrodotoxin citrate, 1069) et Bicuculline (0131) ont été commandés chez Tocris.

Analyse statistique

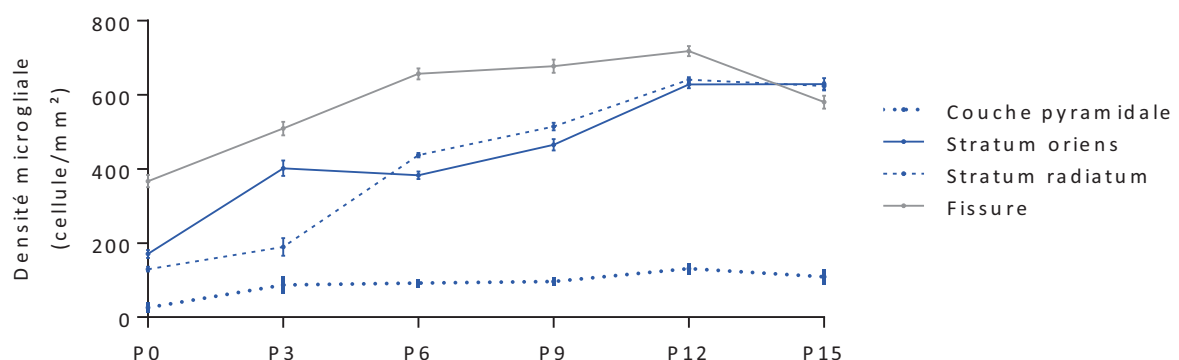
Les données des graphiques sont représentées en valeur moyenne \pm l'erreur-type de la moyenne (SEM). Les analyses statistiques ont été réalisées sur Graphpad Prism. La significativité des résultats a été évaluée par des ANOVA à deux facteurs ou des tests de student (simples ou multiples) selon le nombre de conditions. La valeur de la probabilité est représentée par * pour $P < 0.05$, ** pour $P < 0.01$, *** pour $P < 0.001$ et **** pour $P < 0.0001$.

II. Résultats préliminaires

a. Sur la lignée C57BL6J (black 6)

Quantification de la densité microgliale dans l'Hippocampe en développement de souris sauvages black 6

Nous avons débuté le projet par la mise au point d'une méthode de quantification de la densité microgliale à différents jours du développement postnatal de la souris Black 6, une lignée de type sauvage. Nous avons observé une augmentation progressive du nombre de microglies présentes dans la région CA1 de l'Hippocampe au cours du développement postnatal. Au niveau de la couche pyramidale, la densité microgliale moyenne est la plus faible des régions mesurées et reste comprise entre un minimum de 25.48 microglies par mm^2 à P0 et un maximum de 131.1 à P12. A l'inverse, la densité est la plus importante au niveau de la fissure hippocampique de P0 (366.7 MG/mm^2) à P12 (717.4 MG/mm^2). Dans les strata oriens et radiatum de CA1, l'évolution est plus importante, d'une densité respective moyenne de 170.6 et 129.6 MG/mm^2 à P0 jusqu'à un plateau à P12-P15 (en MG/mm^2 , SO : 627.8- 628.2 ; SR : 640.2-623.0). A P0 puis de P6 à P15, la densité microgliale est similaire de part et d'autre de la couche pyramidale. Cependant, à P3 la densité mesurée est plus importante dans le stratum oriens que radiatum avec 401.4 contre 189.5 MG/mm^2 .

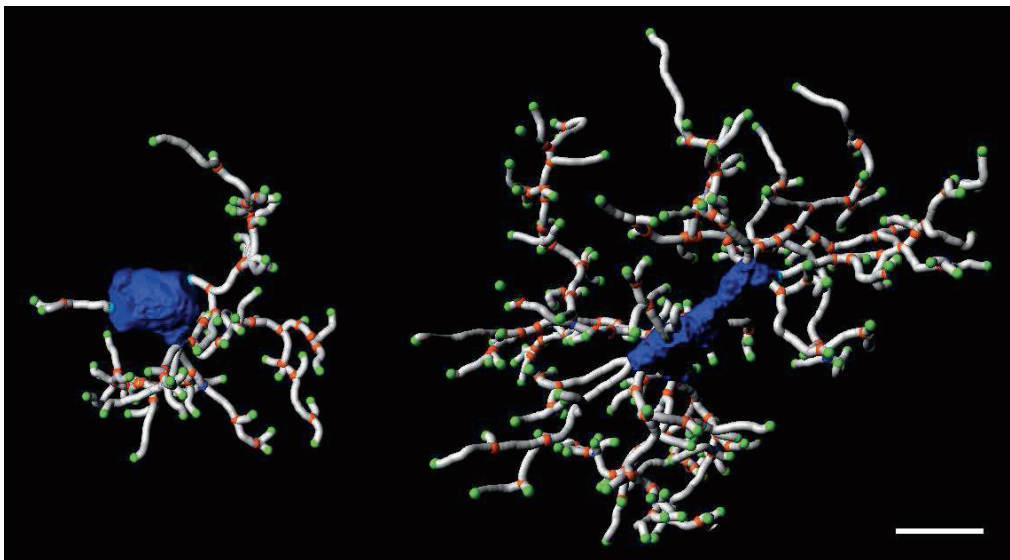


Densité microgliale de l'Hippocampe de souris black 6 au cours du développement postnatal.

Densité des cellules microgliales (MG/mm^2) en fonction du jour postnatal dans les strata pyramidale, oriens et radiatum de CA1 et dans la fissure hippocampique. Avec selon l'âge N, le nombre d'animaux et n, le nombre de coupes utilisées : P0 N=4, n=12 ; P3 N=2, n=7 ; P6 N=5, n=20 ; P9 N=3, n=12 ; P12 N=4, n=16 et P15 N=3, n=12.

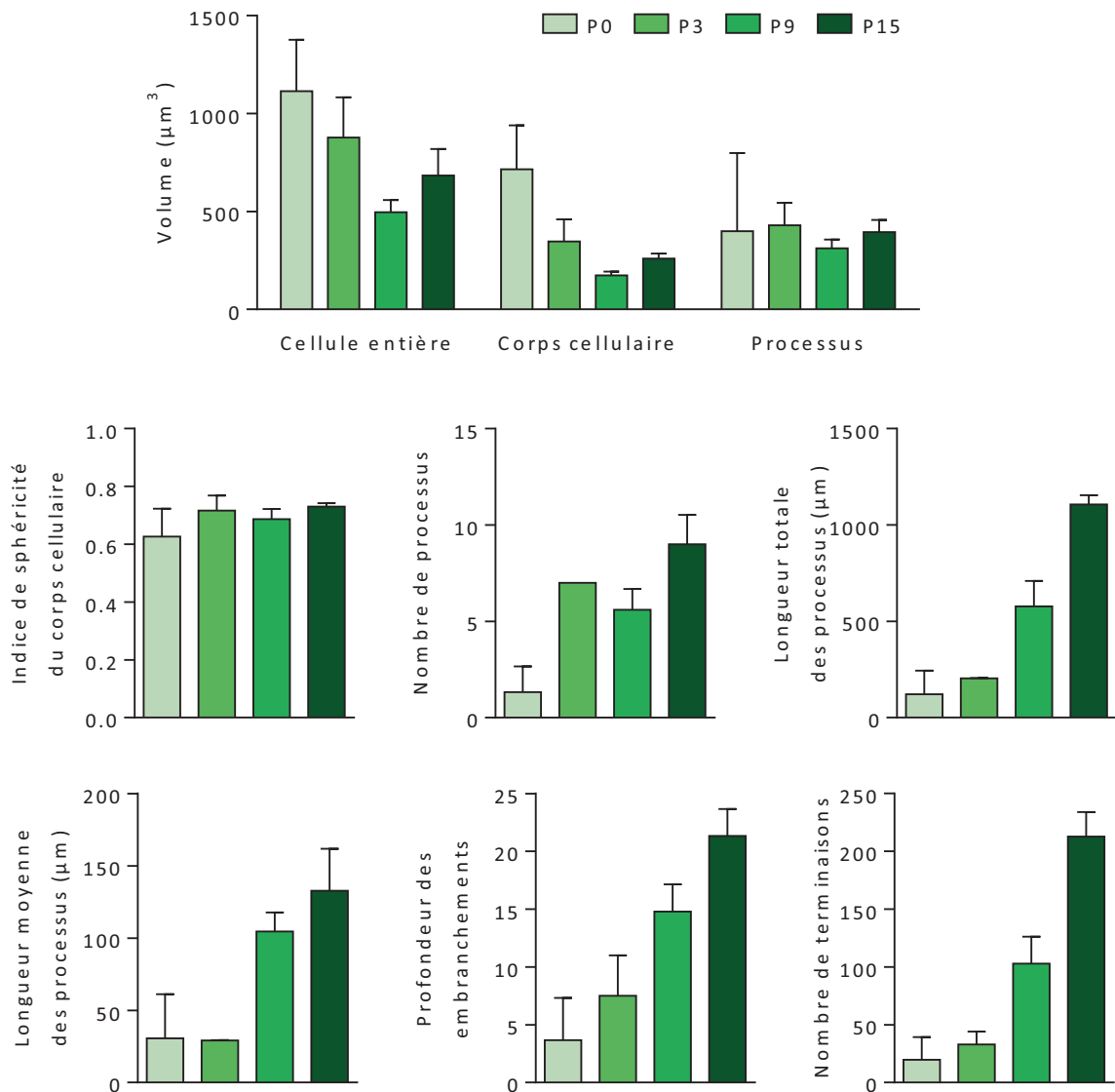
Quantification de l'évolution morphologique des microglies entre P0 et P15

Afin d'évaluer quantitativement l'évolution morphologique des microglies au cours du développement, différents paramètres ont été mesurés à partir des objets reconstruits en 3 dimensions. Entre la naissance et la fin de la seconde semaine postnatale, le volume global de la microglie diminue de $1115,4 \pm 261,1 \mu\text{m}^3$ à P0 (n=3) à $684,510 \pm 135,3572 \mu\text{m}^3$ à P15 (n=3). Cette diminution est corrélée à celle du volume des corps cellulaires (en μm^3 , P0 : $715,8 \pm 223,5$; P15 : $260,0 \pm 24,6$) alors que le volume des processus seuls reste stable (en μm^3 , P0 : $399,6 \pm 399,6$; P15 : $395,6 \pm 61,1$). L'indice de sphéricité du corps cellulaire varie très peu entre P0 et P15 de $0,63 \pm 0,17$ à $0,73 \pm 0,04$. La croissance des processus augmente au cours des deux semaines de développement : le nombre de processus passe de 1 ± 1 à 9 ± 2 , leur longueur cumulée de $122,3 \pm 122,3 \mu\text{m}$ à $1106 \pm 48,6 \mu\text{m}$ et la longueur par processus de $30,6 \pm 30,6 \mu\text{m}$ à $132,7 \pm 29 \mu\text{m}$. De même, l'augmentation du nombre d'embranchement maximum de $3,7 \pm 3,7$ à $21,3 \pm 2,3$ et du nombre de point terminaux de $19,7 \pm 19,7$ à $212,7 \pm 21,2$ reflète la complexification de la morphologie.



Maturation morphologique des microglies entre 0 et 15 jours postnataux.

Reconstruction en trois dimensions des cellules microgliales à partir du marquage immunohistochimique de la molécule Iba1. Reconstructions réalisées sur le logiciel Imaris © à partir d'images obtenues en microscopie confocale. La barre d'échelle correspond à $10 \mu\text{m}$.



Quantifications de la maturation morphologique des microglies entre 0 et 15 jours postnataux.

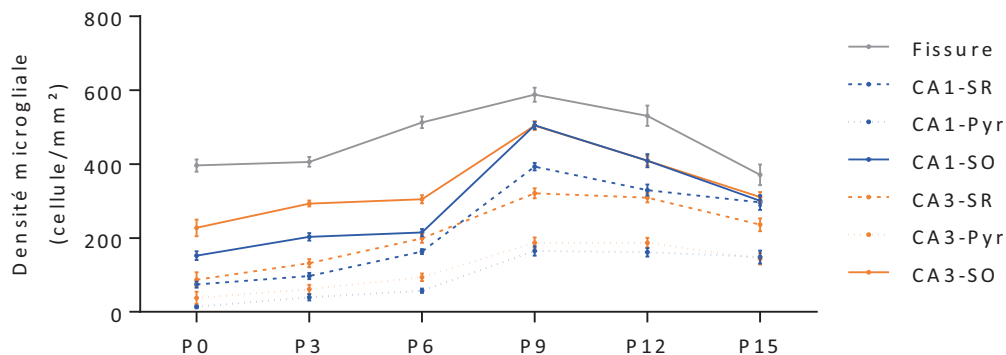
Evaluation de la maturation morphologique selon différents critères mesurés à partir de la reconstruction en trois dimensions de cellules microgliales à P0 (n=3), P3 (n=2), P9 (n=5) et P15 (n=3). A P3, P9 et P15, les mesures des corps cellulaires de cellules supplémentaires ont été ajoutées (1 à P3, 1 à P9 et 6 à P15).

b. Sur les lignées sauvage et modifiées CX3CR1 KO de fond génétique 129

Densité microgliale diminuée chez les souris CX3CR1 KO par rapport aux souris sauvages 129

Nous avons ensuite voulu tester si la voie de signalisation Fractalkine/CX3CR1 influençait la distribution spatiotemporelle des microglies dans l'Hippocampe en développement, en comparant des souris CX3CR1^{GFP/GFP} (KO), dont les microglies n'expriment pas les récepteurs de la Fractalkine, et des souris CX3CR1^{+GFP} (HE) ou sauvages (WT) de même fond génétique 129. Comme chez les souris Black 6, la densité microgliale augmente entre P0 et P15 chez les souris 129, excepté au niveau de la fissure hippocampique.

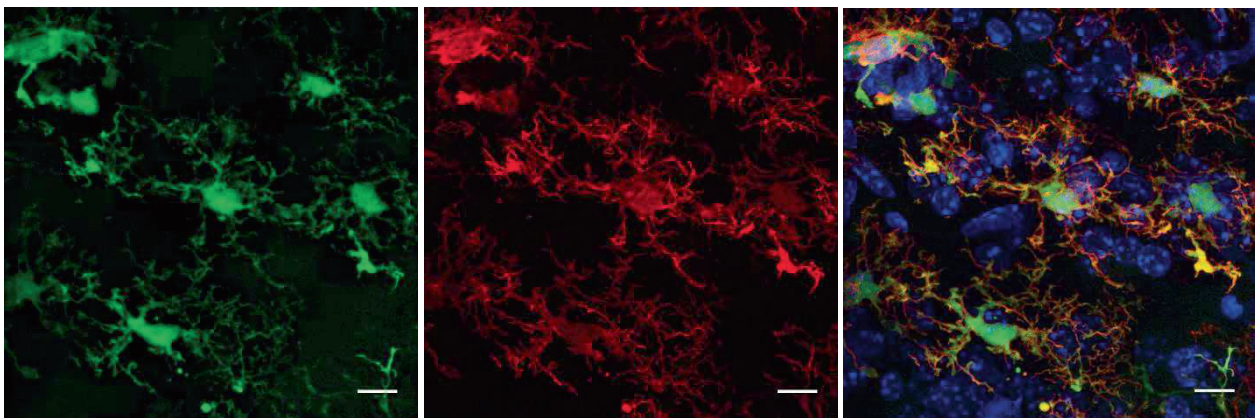
Cependant, le profil d'évolution est différent et la densité microgliale semble atteindre un maximum au début de la seconde semaine postnatale à P9.



Densité microgliale de l'Hippocampe de souris 129 au cours du développement postnatal.

Densité des cellules microgliales (MG/mm²) en fonction du jour postnatal dans les strata pyramidale, oriens et radiatum de CA1 et CA3 et dans la fissure hippocampique. Avec à P0 N=3, n=11 ; P3 N=4, n=15 ; P6 N=4, n=16 ; P9 N=4, n=16 ; P12 N=4, n=16 et P15 N=3, n=11.

Chez les souris CX3CR1^{GFP/GFP} (KO) et CX3CR1^{+GFP} (HE), la totalité ou la moitié des récepteurs CX3CR1 est remplacée par une protéine fluorescente eGFP, marquant ainsi spécifiquement les cellules microgliales Iba1-positives.



Expression de l'eGFP au niveau des cellules microgliales positivement marquées par Iba1.

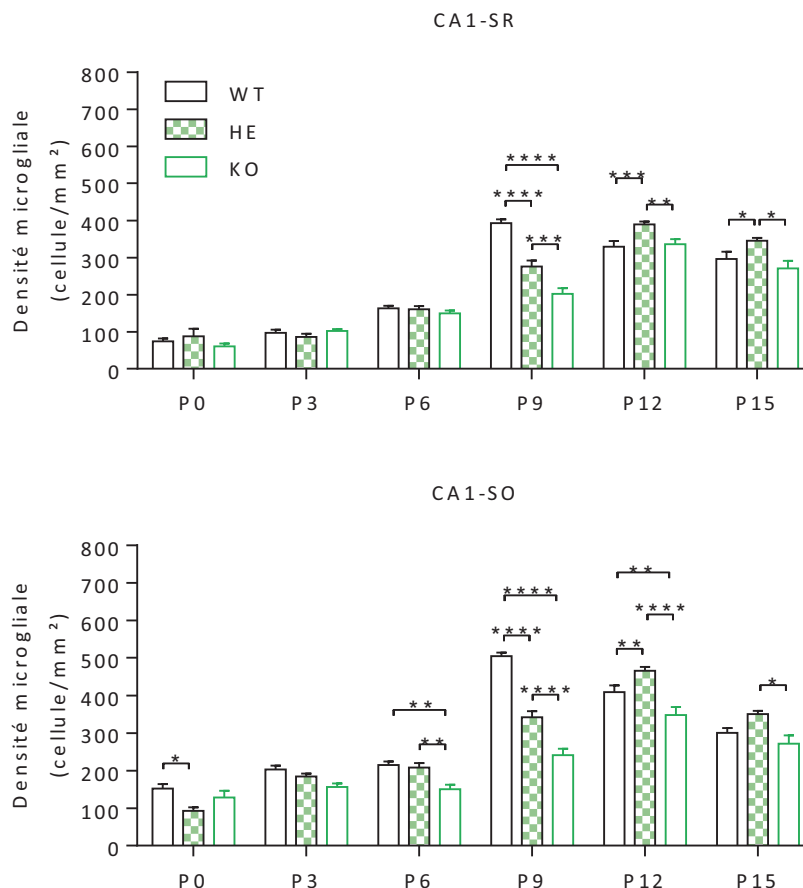
Projections maximales de piles d'images obtenues en microscopie confocale montrant la protéine eGFP exprimée à la place des récepteurs CX3CR1 (vert), le marquage Iba1 des cellules microgliales (rouge) et le marquage DAPI des noyaux (bleu).

La barre d'échelle correspond à 10 µm.

Lorsque l'on examine la densité microgliale suite à la délétion complète ou partielle du récepteur CX3CR1, on constate une diminution dans plusieurs régions de l'Hippocampe. Cette diminution, dont la significativité a été évaluée par des ANOVA à deux facteurs, apparaît à différents jours postnatals selon la région. En

accord avec l'étude de Paolicelli et al. de 2011, la densité microgliale au niveau du stratum radiatum de CA1 est réduite chez les souris KO par rapport aux souris HE au cours de la seconde semaine postnatale. Si l'on compare les souris KO aux souris WT, la réduction apparaît uniquement à P9.

Au niveau du stratum oriens de CA1, la différence entre souris KO et HE est significative jusqu'à la fin de la seconde semaine mais apparaît plus tôt, à partir de P6. La différence entre WT et KO est également visible à partir de P6 mais disparaît après P12.

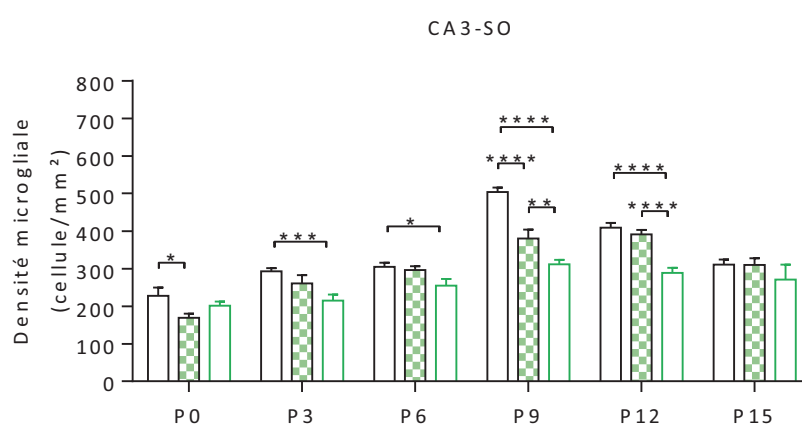
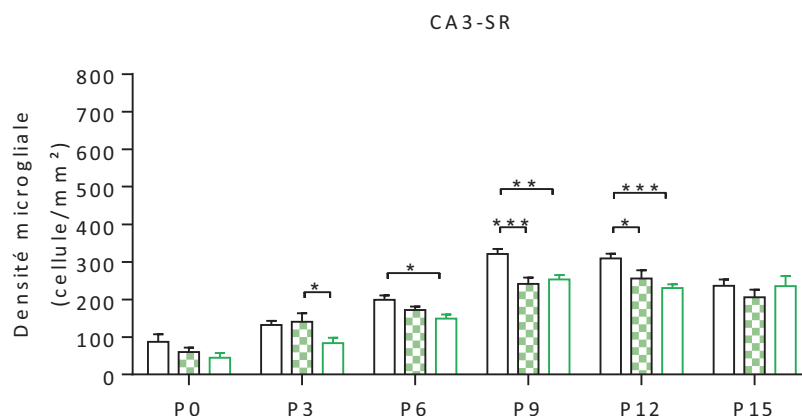


Comparaison de la densité microgliale de l'Hippocampe entre les différents génotypes au cours du développement postnatal

Densité des cellules microgliales (MG/mm²) en fonction du jour postnatal dans les strata radiatum (SR) et oriens (SO) de CA1 et selon le génotype des souris : 129S2/SvPasCrl (WT), CX3CR1^{eGFP/eGFP} (KO) ou CX3CR1^{+eGFP}/129S2/SvPasCrl (HE).

En CA3, dans le stratum radiatum, la densité microgliale n'est réduite chez les KO par rapport aux HE qu'à P3, alors qu'elle est réduite de P6 à P12 par rapport aux WT.

Enfin, dans le stratum oriens de CA3, la densité est réduite à P9 et P12 chez les souris KO par rapport aux souris HE mais dès P3 par rapport aux souris WT.



Comparaison de la densité microgliale de l'Hippocampe entre les différents génotypes au cours du développement postnatal

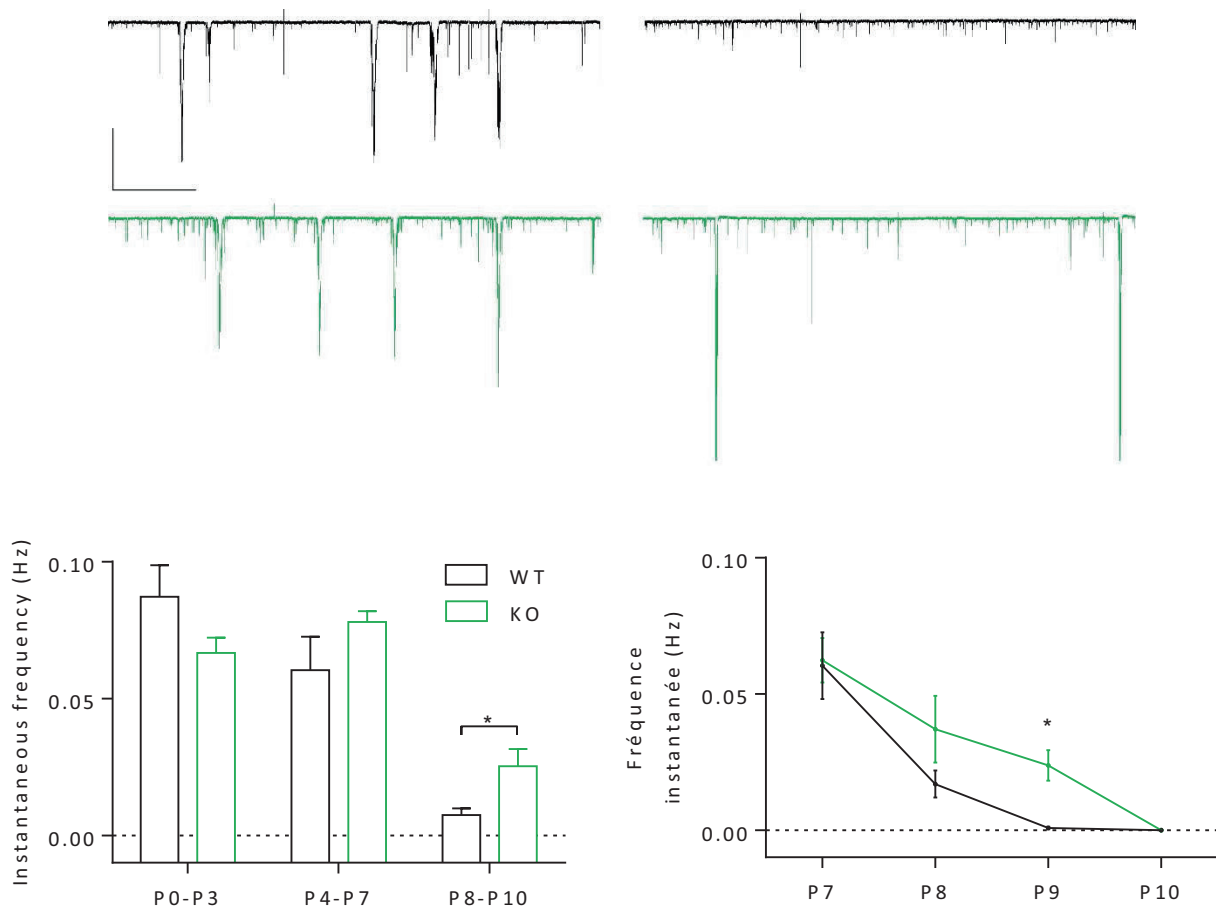
Densité des cellules microgliales (MG/mm²) en fonction du jour postnatal dans les strata radiatum (SR) et oriens (SO) de CA3 et selon le génotype des souris : 129S2/SvPasCrl (WT), CX3CR1^{eGFP/eGFP} (KO) ou CX3CR1^{+eGFP}/129S2/SvPasCrl (HE).

De manière générale, il apparaît clairement que la délétion du récepteur CX3CR1 provoque la réduction du nombre de microglies dans l'Hippocampe confirmant ainsi le rôle de la Fractalkine dans la distribution de la microglie au cours de la période postnatale. Cependant, la différence entre les phénotypes WT et HE pourrait remettre en cause l'utilisation du génotype CX3CR1^{+eGFP} comme condition contrôle.

Augmentation de la fréquence des GDPs chez les souris CX3CR1 KO par rapport aux souris sauvages 129

Nous avons alors voulu savoir si la réduction de la densité microgliale au cours du développement postnatal des souris CX3CR1^{GFP/GFP} (KO) pouvait avoir un impact sur la connectivité de l'Hippocampe et être par conséquent associée à la modification de l'activité de réseau. Chez les souris sauvage (WT), les GDPs sont observables chez les neurones pyramidaux de CA3 jusqu'au début de la deuxième semaine postnatale et leur fréquence diminue progressivement : 0,087 ± 0,012 Hz la première partie de la première semaine, 0,060 ± 0,012 Hz la seconde partie puis 0,007 ± 0,002 au début de la deuxième semaine. Chez les souris KO, la

fréquence des GDPs est similaire à celle des WT au cours de la première semaine ($0,067 \pm 0,005$ à P0-P3 et $0,078 \pm 0,004$ à P4-P7) mais est significativement plus importante dans la période P8-P10 ($0,025 \pm 0,006$). Si l'on détaille la fréquence des GDPs jour par jour entre P7 et P10, on peut constater que la disparition des GDPs visible à P9 chez les WT, n'a lieu qu'à P10 chez les KO.



L'activité de réseau GDPs est maintenue un jour supplémentaire chez les souris CX3CR1 KO

Trace représentatives de l'activité spontanée de neurones pyramidaux de CA3 à P3 (à gauche) et P9 (à droite) chez des souris WT (en noir) et CX3CR1 KO (en vert), et fréquence instantanée (Hz) des GDPs en fonction de la période postnatale P0-P3, P4-P7, P8-P10 ou du jour postnatal P7, P8, P9 ou P10.

Augmentation de la fréquence de l'activité synaptique GABAergique à P8-9 chez les souris CX3CR1 KO par rapport aux souris sauvages 129

L'activité GABAergique étant impliquée dans la génération des GDPs, nous avons ensuite examiné cette activité à P8-P9 en présence et en absence du récepteur CX3CR1. Les courants postsynaptiques GABAergiques spontanés (sIPSCs) et miniatures (mIPSC) ont été enregistrés. Les souris KO et WT présentent des sIPSCs similaires dans leurs amplitudes, intervalles inter événements et cinétiques.

De même, les mIPSC enregistrés en présence de TTX ne montrent aucune différence d'amplitudes ou de cinétiques. Cependant, l'intervalles inter événements est réduit chez les souris KO, traduisant une

augmentation de la fréquence des événements synaptiques médiés par la libération de GABA indépendamment des potentiels d'action.

III. Discussion

L'objectif du travail effectué ici, était de mettre en place différentes approches permettant d'examiner le rôle de la microglie dans le développement de l'activité GABAergique au niveau de l'Hippocampe. Nous avons pour cela pris avantage d'un modèle d'altération constitutive de la fonction microgliale, le modèle transgénique CX3CR1^{eGFP/eGFP}, dans lequel la communication privilégiée entre microglies et neurones par la Fractalkine est manquante. Je discuterai dans cette partie les résultats préliminaires obtenus et introduirai les modifications apportées pour la suite du projet et les raisons qui les justifient.

a. **Reconstruction morphologique de la microglie : une méthode de quantification pertinente de la maturation microgliale.**

Il est aujourd'hui établi que la morphologie de la microglie constitue une source d'information majeure sur son phénotype, sur les fonctions qu'elle assure et par extension sur l'environnement dans lequel elle évolue. Ainsi une morphologie améboïde avec peu ou pas de processus correspond à un état d'activation dans un environnement pathologique, alors qu'une morphologie plus complexe avec un corps cellulaire peu volumineux et des processus nombreux et développés traduit une situation physiologique. La microglie n'atteint cette morphologie mature qu'au terme de plusieurs semaines de développement et la quantification précise de certains paramètres de sa forme rendrait possible la comparaison entre deux conditions. Par exemple, la délétion du récepteur CX3CR1 pourrait provoquer un retard dans la maturation de la microglie ou un changement de ses fonctions et ces altérations pourraient être indirectement reflétées par sa morphologie.

Grâce à la reconstruction en trois dimensions de cellules microgliales de souris de phénotype sauvage (black 6), nous avons pu déterminer des paramètres témoignant de ces changements morphologiques au cours du développement. Parmi ces paramètres, l'étude du volume globale ou du corps cellulaire uniquement montre une diminution marquée qui reflète le passage de la forme améboïde grossière à la forme ramifiée beaucoup plus fine. Étonnamment, l'indice de sphéricité du corps cellulaire ne montre pas de changement significatif malgré la modification visuelle de la forme générale. Les paramètres des processus traduisent quant à eux efficacement les changements majeurs subis par la microglie avec une augmentation du nombre de prolongements, leur allongement ainsi que leur ramification, représentée par l'augmentation de l'embranchement maximum et du nombre de terminaisons.

La mesure de ces paramètres morphologiques permet de quantifier précisément la morphologie de la microglie à un moment donné ou dans une région en particulier, et pourrait ainsi faire émerger de subtiles différences spatiotemporelles dans des conditions physiologiques mais également suite à une altération. Dans une étude récente, la mesure de l'aire totale et du volume des cellules microgliales a par exemple permis de montrer une diminution de la taille des microglies du stratum radiatum de CA1 chez les souris CX3CR1 KO à P8, traduisant selon les auteurs une morphologie moins ramifiée, immature (Pagani et al., 2015). Nos méthodes d'évaluation de la morphologie proposent une analyse plus complète et détaillée de la morphologie qui permettrait de confirmer leurs conclusions.

b. Réduction de la densité microgliale chez les souris dépourvues du récepteur CX3CR1.

Différentes études ont à ce jour démontré l'impact de la délétion du récepteur microglial de la Fractalkine sur la distribution des microglies au cours du développement, avec un retard d'infiltration à l'intérieur des tonneaux du cortex somatosensoriel et une réduction du nombre de microglies dans la sous-région CA1 de l'Hippocampe (Hoshiko et al., 2012; Paolicelli et al., 2011). Afin de confirmer cette diminution avant d'examiner l'activité neuronale, nous avons mis au point une approche nous permettant de quantifier la densité microgliale dans plusieurs aires hippocampiques relativement étendues sur une même tranche de cerveau, tout en optimisant le temps d'acquisition sans sacrifier la résolution. Le système de scanner de lames du Nanozoomer offre un tel compromis entre un agrandissement au 40x et l'automatisation de l'acquisition en épifluorescence. La densité mesurée en CA1 au niveau des strata oriens et radiatum, de la couche pyramidale et de la fissure hippocampique des souris black 6 reflète une augmentation progressive du nombre de microglies pouvant être liée à la migration comme à la prolifération. L'augmentation plus soudaine et marquée dans le stratum oriens à 3 jours postnataux pourrait être due à un signal attractant spécifiquement émis dans cette région. Cependant, cette distribution en oriens à P3 n'est pas visible chez les souris 129 qui ne présentent pas non plus de profil d'augmentation continu jusqu'à la fin de la deuxième semaine postnatale mais sembleraient connaître un pic de densité microgliale au début de la deuxième semaine à P9 qui diminue ensuite jusque P15. Chez les souris dépourvues du récepteur CX3CR1, la densité microgliale est moins importante que chez les souris de génotypes hétérozygote ou sauvage. Cette réduction confirmerait les données précédemment publiées.

c. Les activités de réseau et synaptiques augmentées en l'absence du récepteur CX3CR1

D'après les résultats obtenus, l'activité neuronale de l'Hippocampe semble modifiée chez les souris dépourvues du récepteur microglial CX3CR1. En effet, la fréquence des GDPS est significativement

augmentée à P9 par rapport aux souris de type sauvage, traduisant un retard d'un jour dans la disparition de cette activité de réseau spécifique à la période postnatale. Ce délai pourrait être lié à l'expression retardée des canaux chlorés KCC2, responsables de l'inversion développementale de l'effet du neurotransmetteur GABA sur le potentiel de membrane. Cette augmentation pourrait également être due au nombre plus important de synapses GABAergiques présentes à P8-P9 dont témoignent l'augmentation de fréquence des mIPSCs. Cependant, la délétion du récepteur CX3CR3 ne semble avoir aucun impact sur l'amplitude, la fréquence ou les cinétiques des sIPSCs, ni sur l'amplitude ou les cinétiques des mIPSCs, suggérant que la signalisation Fractalkine n'est pas nécessaire à la maturation des synapses GABAergiques comme elle l'est pour celle des synapses Glutamatergiques (Paolicelli et al., 2011; Hoshiko et al., 2012).

d. Le fond génétique des animaux peut-il induire une variabilité ?

Cependant, en ce qui concerne la mesure de la densité microgliale dans l'Hippocampe, la variabilité entre les deux lignées de type sauvage black6 et 129 souligne la sensibilité de cette mesure et une possible différence selon les génotypes. Or, les animaux que nous avons comparés pour notre étude ne provenaient pas de la même portée mais étaient issus de croisements de souris CX3CR1^{GFP/GFP} de fond génétique mixte 129 à 95 % et black 6 à 5 % entre elles, pour la production de KO, avec des souris 100 % 129, pour celle d'HE ou de souris 129 entre elles pour celle de WT. Les différences observées dans nos conditions expérimentales pourraient donc être imputables à des différences de lignées ou de portées et le rôle de la signalisation Fractalkine ne peut être confirmé. Ces considérations ont également remis en question les différences d'activités observées.

Afin de vérifier ces résultats préliminaires, nous avons cherché à optimiser les conditions d'expérimentation en travaillant sur des portées composées de souris WT, HE et KO grâce au croisement entre elles de souris CX3CR1^{+GFP} de fond génétique 129 à plus de 98.75 %. Nous avons également pris la décision de procéder à la dissection et à l'utilisation simultanée d'un animal de chaque génotype pour les expériences d'électrophysiologie. Enfin, afin de réduire au maximum les sources de variabilité nous avons adopté des critères de comptage des microglies plus stricts dans les expériences d'immunohistochimie, en ne considérant que les corps cellulaires Iba1 positifs colocalisés avec un marquage nucléaire DAPI. Cette méthode permet d'avoir une évaluation plus robuste et reproductible de la densité microgliale.

The neuron-microglia signaling tunes neuronal network, but not synaptic, activity in the neonate hippocampus

Charlotte Bertot¹, Laurent Groc¹, Elena Avignone¹

¹Interdisciplinary Institute for Neuroscience, CNRS UMR 5297, Université de Bordeaux – F33000 Bordeaux FRANCE

Microglial cells colonize the central nervous system since embryonic stages, and they interact with other cell types, including neurons. A specific way of communication between neurons and microglia involves neuronal released fractalkine (CX3CL1) and its specific microglial receptor CX3CR1. CX3CR1 KO mice contributed to unclose microglial role during development. Indeed, CX3CR1 ablation alters microglia distribution in the brain, and it affects glutamatergic transmission and synapse maturation. However, these effects seem to be transient and brain region specific and their mechanisms are poorly understood. Furthermore, some effects observed in juvenile or adult mice may have origin during development, when neuronal connections are established. GABA plays a fundamental role in this process since it is excitatory. The influence of neuron-microglia interaction on neuronal activity in the hippocampus during this period is poorly understood. In particular, nothing is known on GABAergic activity, known to be synaptogenic during this period.

Using CX3CR1 KO mice we investigated how the signaling fractalkine pathway impacts microglial colonization of the hippocampus and neuronal activity during the first two postnatal weeks. Our results indicate that in KO mice there is a reduction in the density of microglial cells at P7-P9 in the CA3 hippocampal area, accompanied at P7 by a significant reduction of frequency of Giant Depolarizing Potentials (GDPs), a network activity involved in hippocampal synapse formation and maturation. Furthermore, despite no overall difference in glutamatergic or GABAergic synaptic activity, GABAergic events display a subpopulation of larger events, and the kinetics was slightly increased.

Thus, the disruption of the specific neuronal-microglia signaling pathway on one hand impacts the microglia colonization of the hippocampus and on the other hands affects specifically neuronal network activity during a time window critical for the establishment of neuronal connections.

Introduction

Microglial cells, the resident macrophages of the central nervous system (CNS), play key physiological role in the developing and adult brain. During development, microglia contribute to the clearance of apoptotic cells (Mallat et al., 2005; Pont-Lezica et al., 2011; Schlegelmilch et al., 2011; Tremblay et al., 2011). Besides this

expected role, microglia also contribute to the remodeling and developmental maturation of glutamate synapses (Roumier et al., 2004; Stevens et al., 2007; Tremblay et al., 2010; Paolicelli et al., 2011; Schafer et al., 2012; Hoshiko et al., 2012). The molecular mechanisms underlying these functions are however not fully elucidated, although the fractalkine signaling pathway between neurons and microglial receptors CX3CR1 seems to be critical (Arnoux et al., 2015). Indeed, the deletion of CX3CR1 in mice impairs the maturation of the glutamatergic AMPA and NMDA receptor-mediated components at developing thalamo-cortical synapses (Hoshiko et al., 2012). Moreover, the number of glutamatergic hippocampal synapses is upregulated in these mice at the end of the second postnatal week (Paolicelli et al., 2011). It has thus been proposed that the fractalkine signaling contribute to the neuronal connectivity and social interaction alterations observed in these mice (Zhan et al., 2014), and more generally to developmental genesis of neuropsychiatric disorders in which an unbalanced activation of microglia is suspected (Schafer et al., 2013; Sierra et al., 2014). However, the establishment of neuronal network and synaptic connectivity early in development greatly rely on neonate GABAergic signaling and specific network activity patterns (Mohajerani and Cherubini, 2006; Ben-Ari et al., 2012). Whether these essential neonatal processes are modulated by the microglial activity, and more specifically by the fractalkine signaling, remains however unexplored.

During development, the hippocampal activity is characterized by specific network activity pattern, namely giant depolarizing potentials (GDPs), which plays a crucial role in the dendrite growth and synaptic formation and maturation (Ben-Ari et al., 1989; Mohajerani and Cherubini, 2006). GDPs are strong depolarizations separated by quiescent intervals, lasting for more than 500ms and superimposed by bursts of action potentials. The GDPs involved large population of pyramidal cells, and are generated by a pool of interneurons (Bonifazi et al., 2009; Allene et al., 2012; Villette et al., 2016). Consistently, both GABAergic and glutamatergic signaling, which are depolarizing and excitatory at this age (Ben-Ari, 2002), constitute the main drive of this network activity. GDPs disappear during the second postnatal week when the GABAergic transmission becomes inhibitory, further emphasizing the key role of the GABAergic signaling in the neonatal establishment of hippocampal circuitries. Here, we thus investigated in the mouse hippocampus whether the neuron-microglia fractalkine pathway contribute to the microglial distribution, as well as the GABAergic and network activities during the first postnatal week. Our data show that CX3CR1 receptor ablation reduces microglial density in the CA3 area at the end of the first postnatal week. More importantly, GDP frequency was significantly reduced at that time in CX3CR1 knock-out (KO) mice when compared to wild type mice. In addition, some features of the GABAergic transmission were also altered, supporting a model in which the interplay between microglia and neuron plays a role in the establishment of the hippocampal network during the neonatal critical window.

Materials and Methods

Animals

Female and male mice from postnatal day 0 (P0) to 16 (P16) mice were used. All experimental procedures followed the guidelines of the University of Bordeaux/Centre National de la Recherche Scientifique Animal Care and Use Committee. The experiments exploring the colonization of microglial cells during the first two postnatal weeks were conducted on 129S2/SvPasCrl wild type mice directly imported from Charles Rivers. All the other experiments were performed using CX3CR1 knockout (KO), heterozygous (HE) and wild type (WT) animals obtained by crossing N6 CX3CR1^{+/eGFP} mice and genotyped at P1. The homozygous CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice (Jung et al., 2000) were derived from C57BL/6 to 129 genetic background by repeated backcrosses (>N4) with 129S2/SvPasCrl wild type mice (Charles Rivers) in the CDTA (Département de Cryopréservation, Distribution, Typage et Archivage animal) in Orléans. N4 progeny were backcrossed until N6 in the specialized animal facility of the Bordeaux University.

Immunohistochemistry

Mice from Postnatal days 3 to 15 (P3 to P15) were anesthetized with an overdose of Pentobarbital (50µL/animal) and perfused transcardially with 0.9% NaCl solution and 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS; Sigma-Aldrich). Newborn mice (P0) were directly sacrificed by decapitation. Brains were postfixed from 4 to 12 hours at 4 °C with the same fixative then rinsed with PBS and stored at 4°C. Coronal 50 mm thick sections were prepared with a VT 1000 Leica vibratome. The coronal sections in hippocampal region were collected floating in PBS. To avoid difference due to the dorsal-ventral axis, only dorsal slices were processed for the immunohistochemistry. Slices were incubated for 2h in a blocking solution (PBS containing 4% BSA and 1% Triton X-100; Sigma-Aldrich) at room temperature, and then incubated 36 hours at 4°C with primary antibodies against the microglia markers Iba1 (1:1000; rabbit polyclonal; Wako) diluted in 2% BSA and 0.2% Triton X-100 PBS. After wash of primary antibody in PBS, slices were incubated 2 h at room temperature with secondary antibody Alexa 568 (antirabbit IgG 1:500; Invitrogen) and then rinsed again. Stained brain slices were mounted with Vectashield H1200 with DAPI (Vector lab).

Acquisition and analysis of fluorescent images

Fluorescent images were acquired using NanoZoomer (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) microscope equipped with a 20x NA 0.75 objective and a 1.75X magnification lens, which allows to image the entire brain with a resolution of 500nm. Images were cropped to isolate the hippocampus, converted into TIFF format using NDP.view2 Viewing software (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) and then imported in ImageJ for analysis. Microglia density was measured in the different hippocampal sub-regions of the dorsal hippocampus: stratum oriens, pyramidal layer, stratum radiatum/lacunoso moleculare of CA1 and

CA3 and hippocampal fissure. Each region was drawn manually on the image containing the DAPI staining, and microglia were manually counted considering only Iba1 positive cells with DAPI staining. The absolute number obtained was then divided by the corresponding analyzed area to calculate microglial density in number of cell per mm².

Slice preparation

Animals were anesthetized with 5% isoflurane during 1 to 1.5 minutes, sacrificed and brain were rapidly removed and dissected. 350 µm thick sagittal slices were cut with a vibratome (Leica VT 1000S) in an ice-cold artificial cerebral spinal fluid (aCSF) containing in mM: 124 NaCl, 3 KCl, 26 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 10 D-Glucose, 2 CaCl₂ and 1 MgCl₂ (295-305 mOsm). To improve slice quality P14-P16 mice brains were cut in an ice-cold sucrose based cutting solution containing in mM: 2 KCl, 26 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 220 Sucrose, 10 D-Glucose, 0.2 CaCl₂ and 6 MgCl₂. Slices were then incubated in aCSF solution for 45–60 min at 34°C, and subsequently maintained at room temperature throughout the duration of the experiment. All solutions were constantly bubbled with carbogène (95% O₂, 5% CO₂) to maintain a neutral pH.

Electrophysiological recording

For electrophysiological recording, individual slices were transferred to a submerged recording chamber perfused with ACSF at 3 mL/min and 30.5 ± 0.5 °C. Electrodes, of 4.5–5.5 MΩ resistance, were prepared from borosilicate pipettes (GC150T-10, Harvard Apparatus) with a vertical micropipette puller (PC-10, Narishige). Intracellular solution contained in mM: 130 KCl, 11 Hepes, 0.1 EGTA, 4 MgCl₂, 4 Na-ATP, 0.3 Na-GTP and 10 Phosphocréatine (295 mOsm). PH was adjusted to 7.3-7.4 with KOH. Whole-cell patch-clamp recordings of CA3 pyramidal cells were performed using infrared differential interference contrast microscopy (Nikon) with a 60x water-immersion objective. All recordings were performed using an EPC10 USB amplifier (HEKA Elektronik) sampled at 10 kHz.

Patched CA3 pyramidal neurons were recognized by their localization within the pyramidal layer and their firing properties. Depolarizing steps in current clamp of different amplitudes were used to measure the threshold and the amplitude of action potentials (30 ms duration), as well as accommodation properties (300 ms duration). Membrane input resistance, capacitance and access resistance were monitored throughout the duration of experiments. Recorded cells with access resistance exceeding 25 MΩ were discarded. Spontaneous activity was measured in voltage clamp at -70mV. To assess GDPs frequency, cells were recorded for 20 minutes. To assess a possible synapse multiplicity, GABAergic and glutamatergic spontaneous and miniature events were recorded in the same cell. 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo-quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX 10 µM) and D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5, 50 µM) were used to block AMPA and NMDA receptors, while bicuculline (20 µM) to block GABA_A

receptors. Miniature synaptic events were recorded in Tetrodotoxin citrate (TTX, 1 μ m). Drugs were applied through the perfusion system. All drugs were purchased from Tocris.

Electrophysiological analysis

Access resistance, input resistance, and capacitance were evaluated using the analysis build up function of Heka software by implementation of automatic measurements and calculation. Action potential threshold and spike amplitude were measured manually in Heka software. To analyze GDPs, long-lasting inward currents were automatically detected using Clampfit software “event detection” process (Molecular Devices) and GDPs were manually identified based on two criteria including minimum amplitude of 300 pA and minimum duration of 150 ms. The duration of GDPs was measured manually.

Homemade software (Detection Mini, M. Goillandeau) was used to analyse spontaneous and miniature events. The percentile 95% value of each trace was measured to evaluate the noise and the detection threshold was set up to 3 times this value. Synaptic currents were then automatically detected and manually controlled.

Behavioral Pre-pulse inhibition experiments

Pre-pulse inhibition of the acoustic startle response (PPI) experiments were conducted on 3 months-old male littermate mice of either CX3CR1 knock-out, heterozygote and wild type phenotypes.

Startle experiments were performed using the StartFear system (Panlab, Barcelona, Spain), which allows to record the signal generated by an animal's movement via a high sensitivity weight transducer. The apparatus was housed in a ventilated, sound-attenuated enclosure (67x53x55 cm). Animals were held in a Plexiglas cylinder (9 cm lengthx3 cm internal diameter) mounted on a frame and held in position in the experimental chamber (25x25x25 cm) by two plastic screws.

Animals were transferred to the experimental room 2 days before the experiment to acclimatize them to the environment. On the day before the test, mice were acclimatized to the apparatus itself for 5 min in the presence of 60 dB of background noise. The pulse trail (P) consists of a single burst of white noise of 120dB lasting 40ms. Pre-pulse trials (pP) consist a 20ms stimulus of different intensity (80, 85, 89 dB)

The startle session was organized in 4 blocks: (I) Acclimation, (II) Habituation, (III) PPI and (IV) Ending.

(I) Acclimation started with a 5 min period in the startle chamber with 60 dB background noise

(II) Habituation consisted of 10 pulse-alone trials to habituate mice to the startle stimulus, verify their response and to adjust the gain for the acquisition; these data were not included in the calculation of the PPI. Animals that did not respond to the first 10 pulse-alone trials were automatically excluded from the experiment.

(III) To assess PPI, animals received 8 trials repeated 6 times in pseudorandom order. The 8 trials included: a pulse-alone trial (P); the three prepulse-alone trials (pP) (3) the three prepulse followed 100 ms after by the pulse trials (pPP); and finally no-stimulus trials (NS) consisting of background noise only. Inter-trial intervals were 22 s long and 60 dB of background noise level was maintained throughout the startle session. (IV) Ending the startle session consisted of 10 pulse-alone trials (120 dB, 40 ms) similar to the Habituation block; these data were neither included in the calculation of the PPI. PPI (%) for each pre-pulse intensity, was calculated as follows: $[100 - (\text{startle amplitude on pre-pulse trial}) / (\text{startle amplitude on pulse alone}) \times 100]$.

Statistical analysis

All data in histogram were presented as mean \pm s.e.m. and statistical evaluation was performed with the program GraphPad Prism. The tests used (2-way ANOVA, 1-way ANOVA or student t-test) and the P-values are specified in the text or in the figure legends. In electrophysiological analysis, each point of frequency values corresponds to the mean frequency of one cell. For amplitudes and kinetics, as values did not fit a Gaussian distribution, points correspond to the median value for each cell. To compare distribution of amplitudes and kinetics between WT and KO, the same number of random events per cell were pooled (200 for IPSC, 50 for EPSC) and Kolmogorov-Smirnov (KS) tests were performed.

Results

Hippocampal postnatal microglial density varies according age and subregion.

Microglia colonizes the hippocampus during the first post-natal week (Fig 1A), when pyramidal neurons develop their dendrites and their connections. To investigate if there is a difference in the colonization in various subregions, we analyzed the distribution of Iba1 positive microglia in the hippocampal fissure, in the stratum pyramidale, in the stratum oriens and in the stratum radiatum of CA1 and CA3 regions (Fig 1B) from P0 to P15. To avoid possible differences of the dorsal/ventral axis, only slices obtained from the dorsal hippocampus were considered. Microglial density showed heterogeneity across ages and areas (Fig 1C). The density in the hippocampal fissure was relatively high since P0 and did not change during the first two post-natal weeks, confirming the idea that could be one of the entry site for microglial cells in the hippocampus (Ashwell, 1991; Dalmau et al., 1997). On the contrary, almost no microglia were detected in the stratum pyramidale from P0 to P6, and the density remained lower than other regions from P9 to P15. In CA1 and CA3 Ammon's horns, including strata oriens and radiatum, the density gradually increased from P3 to P9. Then it remains higher in CA1 compared to CA3 but relatively stable in both regions until P15.

As described before the increase in density was associated to a gradual change in morphology, going from more amoeboid like shape to more ramified one (data not shown).

Fractalkine/CX3CR1 signaling controls microglial cell density in the CA3 region of the developing Hippocampus

We tested whether the signaling pathway between neuron and microglia mediated by Fractalkine and its specific receptor CX3CR1 influences microglial density. To this aim we used CX3CR1^{eGFP/eGFP} mice, which lack fractalkine receptor (Jung et al., 2000). We focus on the second postnatal week (from P7 to P15), when microglia dramatically increase their number, and we compared density in different subregions of CA3 and CA1 area: stratum oriens, and stratum radiatum (including lucidum for CA3). For an accurate comparison, we analyzed microglial density in knockout, heterozygous and wild type mice obtained from the same litters, and analyzed the microglia marked with Iba1 antibody. As previously described, Iba1 and GFP signals are expressed in the same cell population in heterozygous and homozygous mice. Microglial density was determined counting cellular bodies colocalized with the nuclear staining DAPI and quantified in number of cells per mm² (Fig. sup 1).

In CA1 region, the density of microglia was dependent on the postnatal day (Table 1; ANOVA 2-way $p < 0.0001$) whereas the genotype did not significantly affect the density at any age in stratum oriens (ANOVA 2-way $p = 0.4015$) or radiatum (ANOVA 2-way $p = 0.3803$).

In contrary, the density in CA3 region was independent from age factor between P7 and P15 (Table 1; ANOVA 2-way $p = 0.1108$ in oriens; $p = 0.2339$ in radiatum/lucidum), but it was affected by genotype (Table 1; ANOVA 2-way $p = 0.0420$ in oriens; $p = 0.0072$ in radiatum/lucidum). KO mice showed a significant lower density in strata oriens and radiatum/lucidum at P9 (post-hoc Tukey's test in oriens $p = 0.0200$ and in radiatum $p = 0.0078$). Interestingly, the HE mice also showed a decreased density at P9 in stratum radiatum/lucidum compared to WT (post-hoc Tukey's test $p = 0.0041$) but not in stratum oriens (post-hoc Tukey's test $p = 1956$), suggesting an in-between phenotype depending on the subregion.

The lower density was already observed at P7 in stratum oriens of KO and HE mice (Tukey's test WT vs KO $p = 0.0092$; WT vs HE $p = 0.0195$) but not in stratum radiatum (Tukey's test WT vs KO $p = 0.9988$; WT vs HE $p = 0.2719$). The decrease appeared to be transient since no statistically significant difference was observed at P15 in any region (Tukey's test in oriens WT vs KO $p = 0.3081$; WT vs HE $p = 0.7203$; and in radiatum WT vs KO $p = 0.9995$; WT vs HE $p = 0.5037$).

Our results show that Fractalkine receptor deletion in 129S2/SvPasCrl mice has a high heterogeneous effect on microglia density across different hippocampal areas, and they suggest that Fractalkine signaling controls the density of microglial cells in the developing CA3 region of the hippocampus in a specific temporal window around P9.

CA3 pyramidal neurons in CX₃CR₁ deficient mice display intrinsic properties similar to WT

To check if CX₃CR₁ gene is involved in the development of CA3 neurons, we first compared the intrinsic basic properties of CA3 pyramidal neurons in the temporal window P7-P10. During this period KO and WT followed a similar developmental profile. Input resistance of both genotypes decreased with age (Fig 3A) in line with cell maturation and expression of new conductance. Two-way ANOVA analysis revealed a dependence on age factor (2-way-ANOVA, $p < 0.0001$), but not on phenotype ($p = 0.8720$). Likewise, there was no difference between the two genotypes on cell capacitance (Fig 3B; 2-way-ANOVA, $p = 0.7464$). Similarly, no significant difference was found between WT and KO in the properties of action potential: threshold of action potential (Fig 3C; 2-way ANOVA: age $p = 0.1858$, genotype $p = 0.1370$) and spike amplitude (Fig 3D; 2-way ANOVA: age $p = 0.0003$, genotype $p = 0.1987$). The increasing amplitude of action potential with age reflects the maturation of neuronal excitability. Both genotypes showed similar qualitative accommodation properties in response to depolarizing pulses (data not shown). These data suggest that basic intrinsic properties as well excitability are not affected by the CX₃CR₁ signaling between P7 and P10.

GABAergic, but not glutamatergic, synaptic activity affected by Fractalkine/CX₃CR₁ signaling disruption at the end of the first postnatal week

We then investigated if KO mice have different spontaneous synaptic activity at P8-P9, when the microglial density is reduced compared to control.

Spontaneous postsynaptic currents were recorded in CA3 pyramidal neurons (Fig 4A) in the presence of NBQX and D-AP5 to block AMPAR and NMDAR mediated transmission. These events were GABA mediated since addition of bicuculline completely abolished them (data not shown). Although in this temporal window GABA is switching from excitatory to inhibitory effect (Ben-Ari, 2002; Ben-Ari et al., 2012), we have used the term IPSC as a common nomination of GABAergic synaptic events. Spontaneous IPSC (sIPSCs) recorded in KO and WT mice showed similar inter event intervals (IEI in WT: $254.1 \text{ ms} \pm 34.27$; KO: $251.6 \text{ ms} \pm 41.47$; t-test, $p = 0.9635$; data not shown) and frequencies (WT: $3.432 \text{ Hz} \pm 0.4430$; KO: $3.718 \text{ Hz} \pm 0.5951$; t-test, $p = 0.7005$; Fig 4A). Similar results were obtained for action potential independent activity, i.e. miniature IPSC recorded in the presence of TTX (mIPSCs; Fig 4B; IEI in WT: $441.6 \text{ ms} \pm 56.09$; KO: $353.7 \text{ ms} \pm 34.19$; t-test, $p = 0.2026$; data not shown; frequency in WT: $2.061 \text{ Hz} \pm 0.3857$; KO: $2.120 \text{ Hz} \pm 0.1716$; t-test, $p = 0.8928$). To analyze amplitudes and kinetics, two types of statistical analysis were performed: KS test on pull data from all cells (200 events for each cell randomly chosen), and t-test on the median values of all cells. Comparing the median amplitudes of each cells, no statistical significance was detected between WT and KO sIPSCs (Fig 4C; WT: $37.68 \text{ pA} \pm 4.556$; KO: $52.40 \text{ pA} \pm 12.14$; t-test, $p = 0.2536$). However, the cumulative amplitude distribution showed that KO mice display a population with larger events (KS $p < 0.0001$). Similarly, for mIPSCs

the mean amplitude of median value of all cells was not different ($40.69 \text{ pA} \pm 3.215$; KO: $44.76 \text{ pA} \pm 7.262$; t-test, $p=0.6033$; Fig 4D), whereas the cumulative distribution of amplitudes showed that KO mice display a bigger fraction of large events (KS $p=0.0001$). The cumulative distributions of kinetics showed that KO mice display GABAergic events with faster rise time (Fig S1A; KS, $p<0.0001$) and faster decay time (Fig S1B; KS, $p=0.0027$). However, as for amplitudes, no statistically significant difference was observed in the mean of median values in the rise time (WT: $1.481 \text{ ms} \pm 0.1035$; KO: $1.270 \text{ ms} \pm 0.1564$; t-test, $p=0.2670$) or in the decay time (WT: $11.13 \text{ ms} \pm 0.3408$; KO: $10.81 \text{ ms} \pm 0.2676$; t-test, $p=0.4720$; data not shown).

Next we checked the glutamatergic activity during the same temporal window (Fig 5). As expected for this age, the frequency of events is much lower compare to GABAergic activity. Contrary to what reported at P15 in CA1 area (Paolicelli et al., 2011), we did not observe any difference in glutamatergic activity at P8-P9 between WT and KO. Spontaneous activity had similar inter event intervals (WT: $877.3 \text{ ms} \pm 118.0$; KO: $1204 \text{ ms} \pm 262.1$; t-test, $p=0.2722$; data not shown), frequency (WT: $0.7556 \text{ Hz} \pm 0.09909$; KO: $0.8470 \text{ Hz} \pm 0.2197$; t-test, $p=0.7092$; Fig 5A). Similar results were obtained for mEPSC (inter event intervals WT: $1763 \text{ ms} \pm 284.9$; KO: $2349 \text{ ms} \pm 292.1$; t-test, $p=0.1702$; data not shown and frequency WT: $0.4252 \text{ Hz} \pm 0.06415$; KO: $0.3202 \text{ Hz} \pm 0.04091$; t-test, $p=0.1866$; Fig 5B). Due to the low frequency, only 50 events were pulled for cumulative distribution of amplitudes and kinetics. Contrary to GABAergic events, both types of analysis show similar WT and KO amplitudes of both spontaneous (WT: $15.67 \text{ pA} \pm 1.552$; KO: $17.85 \text{ pA} \pm 2.067$; KS, $p=0.7658$; t-test, $p=0.4103$; Fig 5B) and miniature EPSCs (WT: $16.42 \text{ pA} \pm 2.339$; KO: $15.80 \text{ pA} \pm 2.290$; KS, $p=0.8173$; t-test, $p=0.8529$; Fig 5D). The cumulative distributions of kinetics suggested that KO mice display Glutamatergic events with faster kinetics (rise time: KS, $p=0.0148$; Fig S1C; decay time: KS, $p=0.0148$; Fig S1D). However, as for miniature GABAergic events, no difference was observed in their mean kinetics, nether in the rise time (WT: $1.660 \text{ ms} \pm 0.1380$; KO: $1.531 \text{ ms} \pm 0.1062$; t-test, $p=0.4710$) nor in the decay time (WT: $5.361 \text{ ms} \pm 0.4386$; KO: $4.725 \text{ ms} \pm 0.3901$; t-test, $p=0.2948$; data not shown).

Comparing the amplitudes between action potential dependent and independent (with TTX) events in the same cell did not reveal any difference in GABAergic (Fig S2A; paired t-test in WT $p=0.2842$; in KO $p=0.1691$) as well as glutamatergic events (Fig S2B; paired t-test in WT: $p=0.6581$; in KO: $p=0.3321$), suggesting that no multiplicity is present at this age in CA3 in WT or KO mice.

According to these results, Fractalkine/CX3CR1 signaling appears to not affect synaptic glutamatergic activity in CA3 at the beginning of the second postnatal week. However, if mean amplitudes of GABAergic events are not different between wild type and CX3CR1 deficient mice, a subpopulation of larger events are generated when Fractalkine communication is disrupted.

Reduced frequency of a developmentally regulated network activity in CX₃CR₁ deficient mice

Since the two types of amplitude analysis of GABAergic events show different results, we tested if the subpopulation of larger events in KO could be correlated with an amplified alteration of the network activity. The network activity of the hippocampus is characterised during the first postnatal week by giant depolarizing potentials (GDPs; Ben-Ari, 2001), which depend on both glutamatergic and GABAergic currents. We tested GDPs towards the end of the first postnatal week, when they start to decrease in frequency and disappear (Fig 6). GDPs were present in both WT and KO mice between P7 and P9, decreasing progressively their frequency, and became rare at P10 (Fig 6A-B). Bicuculline (20 μ M) or NBQX (10 μ M) plus D-AP5 (50 μ M) completely abolished GDPs in both KO and WT slices, confirming their dependence on GABA and Glutamate receptors-mediated transmission. The duration of events was similar in both genotypes and decreased with age (Fig 6C; 2-way ANOVA: age $p < 0.0001$, genotype $p = 0.5113$). However, genotype affected their frequency (2-way ANOVA: age $p < 0.0001$, genotype $p = 0.0015$). Compared to their WT littermate, KO mice showed almost half number of events at P7 (events/minute in WT: 3.24 ± 0.61 ; KO: 1.39 ± 0.32 ; Sidak's test $p < 0.0001$), while no statistically significant difference was observed at the other ages (Sidak's test at P8, $p = 0.4649$; P9-P10 $p > 0.99$). These results suggest that Fractalkine/CX₃CR₁ signaling significantly modulates the frequency of neuronal network activity at the end of the first postnatal week of development.

Alteration of GABAergic synaptic activity maintained through the second postnatal week in CX₃CR₁ deficient mice

We then checked if the maturation of GABAergic signaling is similar in the absence of fractalkine receptors, and if the subpopulation of larger events observed at P8-9 is still present at P14-16. Similarly to the P7-P10 groups, no statistically significant difference was observed in basic intrinsic properties such as input resistance (WT: $229,7 \pm 21.17$; KO: $190,7 \pm 8.11$; t-test $p = 0.0698$), membrane capacitance (WT: $149,1 \pm 19.84$; KO: $194,5 \pm 26.05$; t-test $p = 0.2199$), threshold of action potential (WT: -42.32 ± 0.79 ; KO: -41.96 ± 1.30 ; t-test $p = 0.8334$) and spike amplitude (WT: $77,57 \pm 2.25$; KO: $76,17 \pm 2.33$; t-test $p = 0.6834$). Compared to events recorded at P8-P9, spontaneous GABAergic events frequency was increased in both WT (6.42 ± 0.95 Hz; t-test $p = 0.0042$; Fig 7A), and KO mice (7.94 ± 1.1 Hz; t-test $p = 0.0016$; Fig 7A). Similar results were obtained for mIPSCs (WT: 5.93 ± 0.75 Hz; t-test $p < 0.0001$; KO: 7.94 ± 1.1 Hz; t-test $p = 0.0016$). In contrast, the mean amplitude did not change with age for sIPSCs (WT: 41.39 ± 3.92 pA at P14-16; t-test $p = 0.5966$; KO: 41.39 ± 3.92 pA; t-test $p = 0.7684$) or mIPSC (WT: 45.73 ± 4.69 pA; t-test $p = 0.9161$; KO: 44.76 ± 7.26 pA to 45.73 ± 4.69 pA; t-test $p = 0.9161$). Consistently with synapses maturation, there was a decrease in rise time mIPSCs in both genotypes (Fig 8A; B; WT: 0.85 ± 0.05 ms; t-test $p = 0.0005$ compared to P8-P9; KO: 0.76 ± 0.06 ms; t-test, $p = 0.0095$ compared to P8-P9), as well in decay time (Fig 8A,C; WT: 9.52 ± 0.18 ms; t-test, $p = 0.0039$ compared to P8-P9; KO: 8.75 ± 0.34 ms; t-test, $p = 0.0001$ compared to P8-P9).

Comparing GABAergic events recorded at P14-16 neurons between KO and WT mice, we observed similar differences detected at P8-P9. The mean amplitude of median values of each cell of spontaneous and miniature events was not statistically significant different between WT (Fig 7C-D; t-test, sIPSCs: $p=0.4130$; mIPSCs: $p=0.4573$), while KS analysis indicated larger GABAergic events in KO mice (KS, sIPSCs: $p=0.0030$; mIPSCs: $p<0.0001$). KS analysis of KO distribution showed faster kinetics compared to WT (Fig S1E-F; rise time: KS, $p<0.0001$; decay time: KS, $p<0.0001$) whereas the mean values were similar in both genotypes (Fig S1E-F; rise time: t-test, $p=0.2639$; decay time: t-test, $p=0.1028$). Finally, no difference was observed between action potential dependent and independent (with TTX) amplitude events in the same cell (Fig S2C; paired t-test in WT $p=0.8195$; in KO $p=0.5826$).

All our results suggest that the maturation of GABAergic synapses is similar in WT and KO mice, and that a population with larger events and faster kinetics observed in KO at P8-P9 is maintained at the end of the second postnatal week.

CX₃CR₁ deficient mice do not display positive symptoms of schizophrenia in pre-pulse inhibition test

CX₃CR₁ knock-out mice have been related to cognitive and behavioral deficits, including learning, memory, social interaction and increased repetitive behavior (Rogers et al., 2011; Zhan et al., 2014). Recently some evidences suggested that microglia may be implicated in the emergence of neuropsychiatric disorders like schizophrenia (Weickert and Weickert, 2016). Thus, we tested if in our mice model which showed decreased microglial density, reduced network activity and a subpopulation of larger GABAergic events during development, there was an alteration of sensorimotor gating information in the adult. To this aim, we tested if the startle reaction to the acoustic stimuli (120 dB) was decreased when preceded by a prePulse of three different intensities (80, 85 and 89 dB) in the KO, WT and heterozygous mice (Fig 9). All genotypes displayed a similar decrease in startle response dependent on the intensity of the prePulse without any statistical differences between genotypes (in % of PPI after 80, 85 or 89 dB in WT: 17.73 ± 3.43 , 29.37 ± 7.12 , 42.08 ± 6.75 ; HE: 20.52 ± 6.94 , 37.85 ± 8.47 , 48.88 ± 8.71 ; and KO: 21.13 ± 5.35 , 29.53 ± 4.26 , 46.20 ± 6.27 ; 2-way ANOVA, $p<0.0001$ for prePulse intensity, $p=0.5301$ for genotypes). This result did not suggest that adult CX₃CR₁ deficient mice could display positive symptoms of schizophrenia.

Discussion

Microglial cells are already present in the CNS when neurons migrate, proliferate, differentiate, and establish functional networks. It has recently emerged that a proper interplay between neurons and microglia is essential for the establishment and maturation of synaptic networks in the developing brain (Schafer et al., 2013; Sierra et al., 2014). Our results indicate that at P7-P9 fractalkine signaling controls the density of

microglia in the CA3 region of the hippocampus. Furthermore, the frequency of GDPs is decreased in CX3CR1 KO mice at P7.

Microglia derive from myeloid progenitors born in the yolk sac and colonize the CNS during embryonic and early postnatal life (Pont-Lezica et al., 2011). This colonization occurs in successive waves and, in rodents, lasts until the second postnatal week. Comparing the effect of fractalkine on microglia distribution, previous studies found a difference in the pattern of colonization of the barrel cortex without difference in total density (Hoshiko et al., 2012), while a transient decrease has been observed at P8 and P15 in SR of CA1 hippocampal region (Paolicelli et al., 2011). Our analysis of microglia density in different hippocampal areas during the development shows that it sharply increases between P6 and P9 and then it remains rather stable until P15, although the absolute number of microglia increased (data not shown). Despite the density increase is observed both in WT and KO mice, it was reduced in CA3 region in KO mice at P7-P9. An interesting observation is that heterozygous mice can be different from the WT, suggesting that cautiousness should be apply in using of heterozygous in the study of the role of fractalkine. Contrary to a previous study our analysis did not show any statistical significant difference in density in CA1 area, or at P15. This could be due to method used to quantify microglial density or to the different genetic background (Routh et al., 2009). Thus, our work supports the hypothesis that fractalkine may regulate microglia density in a spatial and temporal specific manner.

The P7-P9 window is particular important during development. The neurons still expand their dendritic tree and their axons, while glutamatergic synapses are established and dendritic spines forms. Meanwhile GDPs progressively decreases their frequency, until they disappear. This is accompanied by a gradual change in the reversal of chloride towards more negative potential. GABAergic transmission is particularly important during the development. Thanks to its excitatory role, it can induce synaptogenesis of both glutamatergic and GABAergic synapses (Oh et al., 2016). Furthermore, interneuron dysfunction and defects in the excitation/inhibition balance have been associated with several neurodevelopmental disorders including Autism Spectrum Disorders (ASD) or Schizophrenia.

Suppression of Fractalkine signaling using CX3CR1 KO mice alters glutamatergic transmission at the end of the second post-natal week as well social interaction in the adult (Paolicelli et al., 2011; Zhan et al., 2014). It has been proposed that impairment of spine pruning from microglia could be responsible for these effects. However, these modifications may originate during development (Melamed et al., 2014). Interestingly, genetically modified mice with autistic behavior show alteration of GDPs frequency, though both increase (Pizzarelli and Cherubini, 2013) and decreased (Cellot et al., 2016) frequency have been reported. Our results show a reduced frequency of GDPs at P7 in KO mice compared to WT, although they disappear at the same post-natal age. Thus, changes in KO mice in network activity in the first postnatal week, may participate in the alterations observed in CX3CR1 KO mice later on.

GDPs frequency depends on the excitatory/inhibitory balance so many mechanisms could be responsible for the observed effect. There was no statistically significant difference on the GDPs duration between KO and WT mice. Furthermore, the analysis of glutamatergic transmission does not reveal any difference. Similarly, the mean amplitude or frequency of GABAergic transmission was not affected, although events in KO mice seems to be faster and KS analysis revealed a population with larger events. However how these mild changes would affect network activity it is difficult to predict. Indeed the net effect of GABA, excitatory or inhibitory, at this age is not known and may change locally and dynamically (Khalilov et al., 2015).

How microglia could affect GDPs frequency it is not clear, but two main mechanisms types may be involved: release of factors, influence on the circuit formation. CX3CR1 signaling is necessary for the development of several morphological and physiological features of microglia (Pagani et al., 2015), thus it could also affect factors release. Microglia may release BDNF and affect the chloride reversal, thus GABA effect, by regulating KCC2 (Coull et al., 2005; Ferrini et al., 2013). However, this mechanism is unlikely since the extinction of GDPs occurs at the similar postnatal day and KCC2 immunostaining in KO mice was similar to WT (data not shown). Microglia can also release ATP (Pascual et al., 2012), which in turn may affect GDPs (Safiulina et al., 2005). CX3CR1 ablation modify circuit formation affecting outgrowth of dopaminergic axons in the forebrain and the laminar positioning of subsets of neocortical interneurons (Squarzoni et al.). Interneurons play a fundamental role in GDPs generation, since some of them have been suggested to be hyper connected through both electrically and chemical synapses forming a hub (Bonifazi et al., 2009). Genetic fate mapping shows that early-generated GABA cells form a subpopulation of these hub neurons, which may correspond to somatostatin expressing interneurons (Picardo et al., 2011; Villette et al., 2016). Furthermore, activation of interneurons can positively or negatively modulate GDPs frequency according to their embryonic lineage (Wester and McBain, 2016). Hence setting alteration of GABAergic cells may affect GDPs frequency.

Collectively our data show that neuron-microglia interaction affects both microglial density and neuronal activity during the second post-natal week. While the observed effects may participate to synaptic remodeling and connections observed later during development or on the adult, further studies need to clarify the mechanisms. Understand and differentiate the consequences of microglia-neuron interaction in structural changes from its direct influence on synaptic transmission is a future challenge.

References

Allene, C., Picardo, M.A., Becq, H., Miyoshi, G., Fishell, G., and Cossart, R. (2012). Dynamic changes in interneuron morpho-physiological properties mark the maturation of hippocampal network activity. *J. Neurosci.* 32, 6688.

Arnoux, I., Audinat, E., Arnoux, I., and Audinat, E. (2015). Fractalkine Signaling and Microglia Functions in the Developing Brain, Fractalkine Signaling and Microglia Functions in the Developing Brain. *Neural Plast. Neural Plast.* 2015, 2015, e689404.

- Ashwell, K. (1991). The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *58*, 1–12.
- Ben-Ari, Y. (2001). Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci.* *24*, 353–360.
- Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* *3*, 728–739.
- Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R., and Gaiarsa, J.L. (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J. Physiol.* *416*, 303.
- Ben-Ari, Y., Khalilov, I., Kahle, K.T., and Cherubini, E. (2012). The GABA Excitatory/Inhibitory Shift in Brain Maturation and Neurological Disorders. *The Neuroscientist* *18*, 467–486.
- Bonifazi, P., Goldin, M., Picardo, M.A., Jorquera, I., Cattani, A., Bianconi, G., Represa, A., Ben-Ari, Y., and Cossart, R. (2009). GABAergic hub neurons orchestrate synchrony in developing hippocampal networks. *Science* *326*, 1419–1424.
- Cellot, G., Maggi, L., Castro, M.A.D., Catalano, M., Migliore, R., Migliore, M., Scattoni, M.L., Calamandrei, G., and Cherubini, E. (2016). Premature changes in neuronal excitability account for hippocampal network impairment and autistic-like behavior in neonatal BTBR T+tf/J mice. *Sci. Rep.* *6*.
- Coull, J.A.M., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M.W., and De Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* *438*, 1017–1021.
- Dalmau, I., Finsen, B., Tønder, N., Zimmer, J., González, B., and Castellano, B. (1997). Development of microglia in the prenatal rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* *377*, 70–84.
- Ferrini, F., Trang, T., Mattioli, T.-A.M., Laffray, S., Del’Guidice, T., Lorenzo, L.-E., Castonguay, A., Doyon, N., Zhang, W., Godin, A.G., et al. (2013). Morphine hyperalgesia gated through microglia-mediated disruption of neuronal Cl⁻ homeostasis. *Nat. Neurosci.* *16*, 183–192.
- Hoshiko, M., Arnoux, I., Avignone, E., Yamamoto, N., and Audinat, E. (2012). Deficiency of the Microglial Receptor CX3CR1 Impairs Postnatal Functional Development of Thalamocortical Synapses in the Barrel Cortex. *J. Neurosci.* *32*, 15106–15111.
- Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A., and Littman, D.R. (2000). Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 4106–4114.
- Khalilov, I., Minlebaev, M., Mukhtarov, M., and Khazipov, R. (2015). Dynamic Changes from Depolarizing to Hyperpolarizing GABAergic Actions during Giant Depolarizing Potentials in the Neonatal Rat Hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *35*, 12635–12642.
- Mallat, M., Marín-Teva, J.L., and Chéret, C. (2005). Phagocytosis in the developing CNS: more than clearing the corpses. *Curr. Opin. Neurobiol.* *15*, 101–107.
- Melamed, O., Levav-Rabkin, T., Zukerman, C., Clarke, G., Cryan, J.F., Dinan, T.G., Grossman, Y., and Golan, H.M. (2014). Long-lasting glutamatergic modulation induced by neonatal GABA enhancement in mice. *Neuropharmacology* *79*, 616–625.
- Mohajerani, M.H., and Cherubini, E. (2006). Role of giant depolarizing potentials in shaping synaptic currents in the developing hippocampus. *Crit. Rev. Neurobiol.* *18*, 13–23.

- Oh, W.C., Lutz, S., Castillo, P.E., and Kwon, H.-B. (2016). De novo synaptogenesis induced by GABA in the developing mouse cortex. *Science* 353, 1037–1040.
- Pagani, F., Paolicelli, R.C., Murana, E., Cortese, B., Angelantonio, S.D., Zurolo, E., Guiducci, E., Ferreira, T.A., Garofalo, S., Catalano, M., et al. (2015). Defective microglial development in the hippocampus of Cx3cr1 deficient mice. *Front. Cell. Neurosci.* 111.
- Paolicelli, R.C., Bolas, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., et al. (2011). Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science* 333, 1456–1458.
- Pascual, O., Achour, S.B., Rostaing, P., Triller, A., and Bessis, A. (2012). Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E197.
- Picardo, M.A., Guigue, P., Bonifazi, P., Batista-Brito, R., Allene, C., Ribas, A., Fishell, G., Baude, A., and Cossart, R. (2011). Pioneer GABA cells comprise a subpopulation of hub neurons in the developing hippocampus. *Neuron* 71, 695.
- Pizzarelli, R., and Cherubini, E. (2013). Developmental regulation of GABAergic signalling in the hippocampus of neuroligin 3 R451C knock-in mice: an animal model of Autism. *Front. Cell. Neurosci.* 7.
- Pont-Lezica, L., Béchade, C., Belarif-Cantaut, Y., Pascual, O., and Bessis, A. (2011). Physiological roles of microglia during development. *J. Neurochem.* 119, 901–908.
- Rogers, J.T., Morganti, J.M., Bachstetter, A.D., Hudson, C.E., Peters, M.M., Grimmig, B.A., Weeber, E.J., Bickford, P.C., and Gemma, C. (2011). CX3CR1 Deficiency Leads to Impairment of Hippocampal Cognitive Function and Synaptic Plasticity. *J. Neurosci.* 31, 16241–16250.
- Roumier, A., Béchade, C., Poncer, J.-C., Smalla, K.-H., Tomasello, E., Vivier, E., Gundelfinger, E.D., Triller, A., and Bessis, A. (2004). Impaired Synaptic Function in the Microglial KARAP/DAP12-Deficient Mouse. *J. Neurosci.* 24, 11421–11428.
- Routh, B.N., Johnston, D., Harris, K., and Chitwood, R.A. (2009). Anatomical and Electrophysiological Comparison of CA1 Pyramidal Neurons of the Rat and Mouse. *J. Neurophysiol.* 102, 2288.
- Safiulina, V.F., Kasyanov, A.M., Sokolova, E., Cherubini, E., and Giniatullin, R. (2005). ATP contributes to the generation of network-driven giant depolarizing potentials in the neonatal rat hippocampus. *J. Physiol.* 565, 981–992.
- Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Barres, B.A., and Stevens, B. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron* 74, 691–705.
- Schafer, D.P., Lehrman, E.K., and Stevens, B. (2013). The “Quad-partite” Synapse: Microglia-Synapse Interactions in the Developing and Mature CNS. *Glia* 61, 24–36.
- Schlegelmilch, T., Henke, K., and Peri, F. (2011). Microglia in the developing brain: from immunity to behaviour. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 5–10.
- Sierra, A., Tremblay, M.-È., and Wake, H. (2014). Never-resting microglia: physiological roles in the healthy brain and pathological implications. *Front. Cell. Neurosci.* 8.
- Squarzoni, P., Oller, G., Hoeffel, G., Pont-Lezica, L., Rostaing, P., Low, D., Bessis, A., Ginhoux, F., and Garel, S. Microglia Modulate Wiring of the Embryonic Forebrain. *Cell Rep.*

- Stevens, B., Allen, N.J., Vazquez, L.E., Howell, G.R., Christopherson, K.S., Nouri, N., Micheva, K.D., Mehalow, A.K., Huberman, A.D., Stafford, B., et al. (2007). The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell* *131*, 1164–1178.
- Tremblay, M.-È., Lowery, R.L., and Majewska, A.K. (2010). Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience. *PLOS Biol* *8*, e1000527.
- Tremblay, M.-E., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., Bessis, A., and Nimmerjahn, A. (2011). The Role of Microglia in the Healthy Brain. *J. Neurosci.* *31*, 16064–16069.
- Villette, V., Guigue, P., Picardo, M.A., Sousa, V.H., Leprince, E., Lachamp, P., Malvache, A., Tressard, T., Cossart, R., and Baude, A. (2016). Development of early-born γ -Aminobutyric acid hub neurons in mouse hippocampus from embryogenesis to adulthood. *J. Comp. Neurol.* *524*, 2440.
- Weickert, C.S., and Weickert, T.W. (2016). What's Hot in Schizophrenia Research? *Psychiatr. Clin. North Am.* *39*, 343–351.
- Wester, J.C., and McBain, C.J. (2016). Interneurons Differentially Contribute to Spontaneous Network Activity in the Developing Hippocampus Dependent on Their Embryonic Lineage. *J. Neurosci.* *36*, 2646–2662.
- Zhan, Y., Paolicelli, R.C., Sforzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., Vyssotski, A.L., Bifone, A., Gozzi, A., Ragozzino, D., et al. (2014). Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat. Neurosci.* *17*, 400–406.

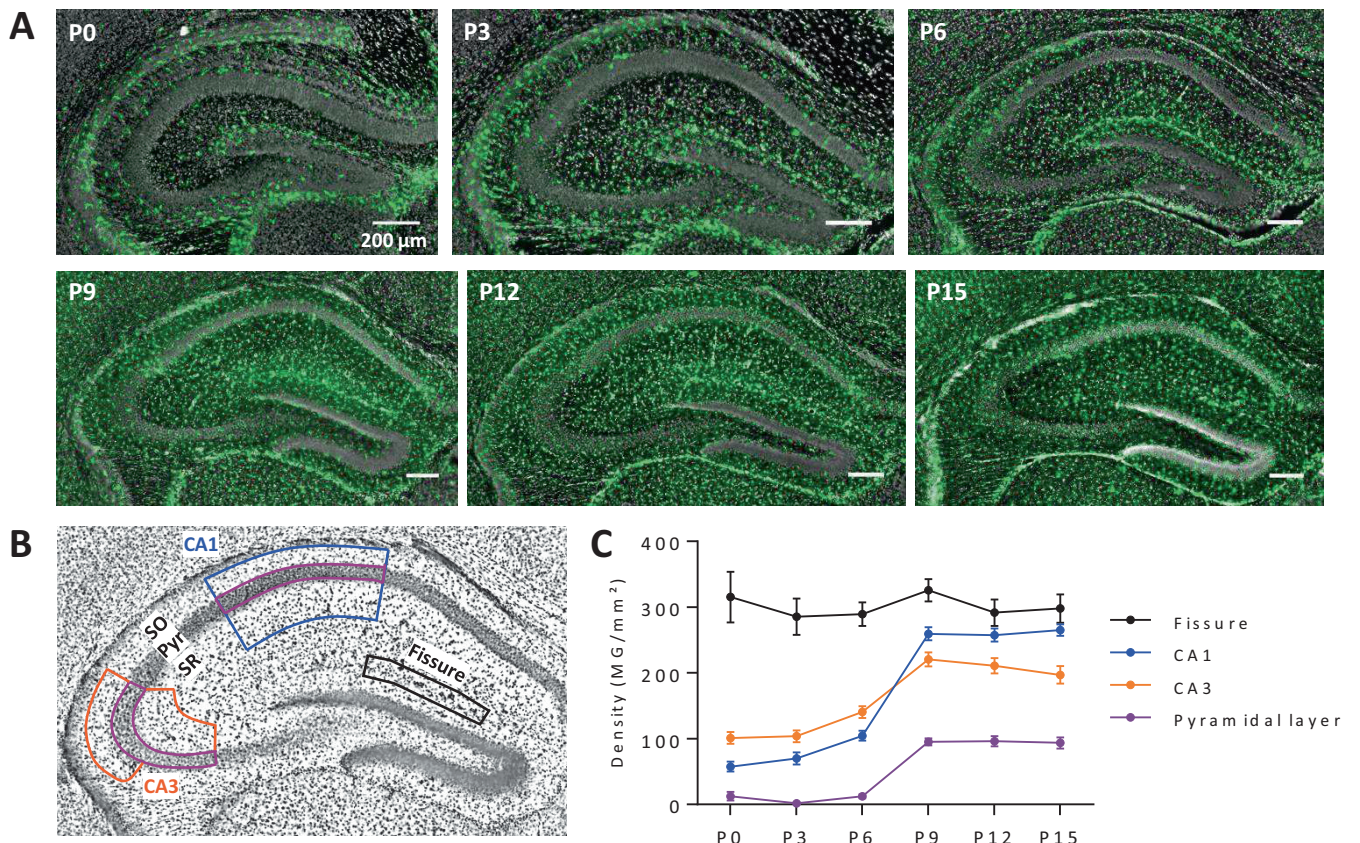


Figure 1

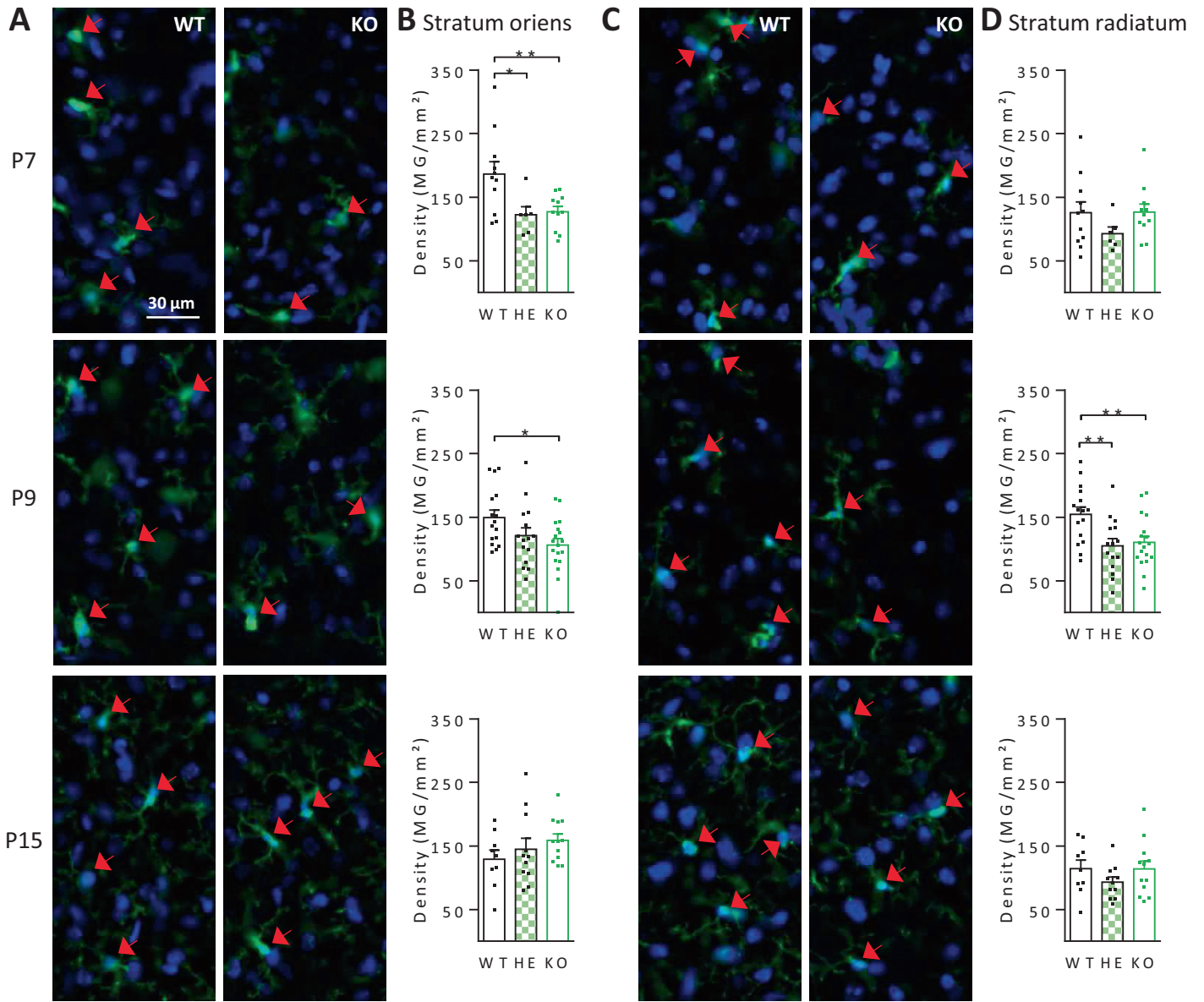


Figure 2

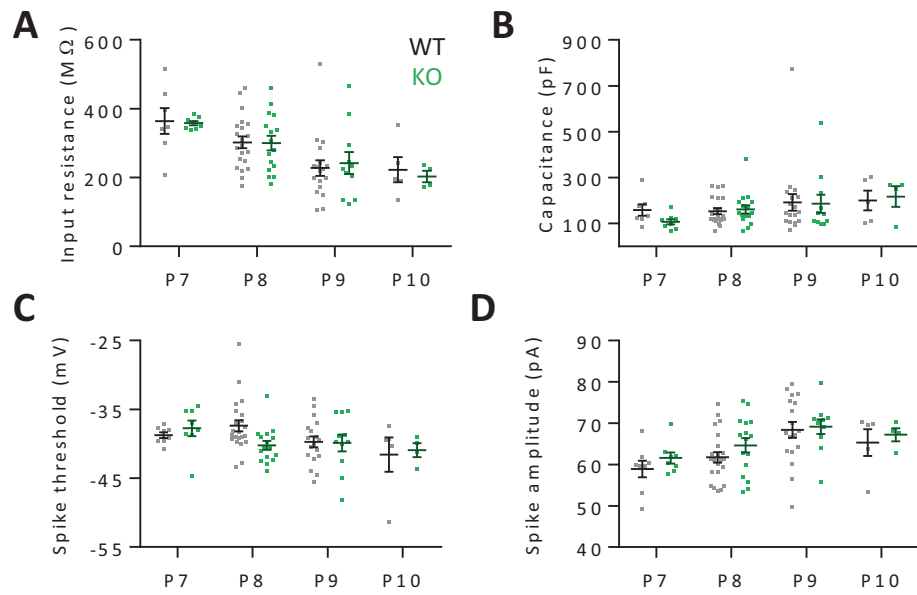


Figure 3

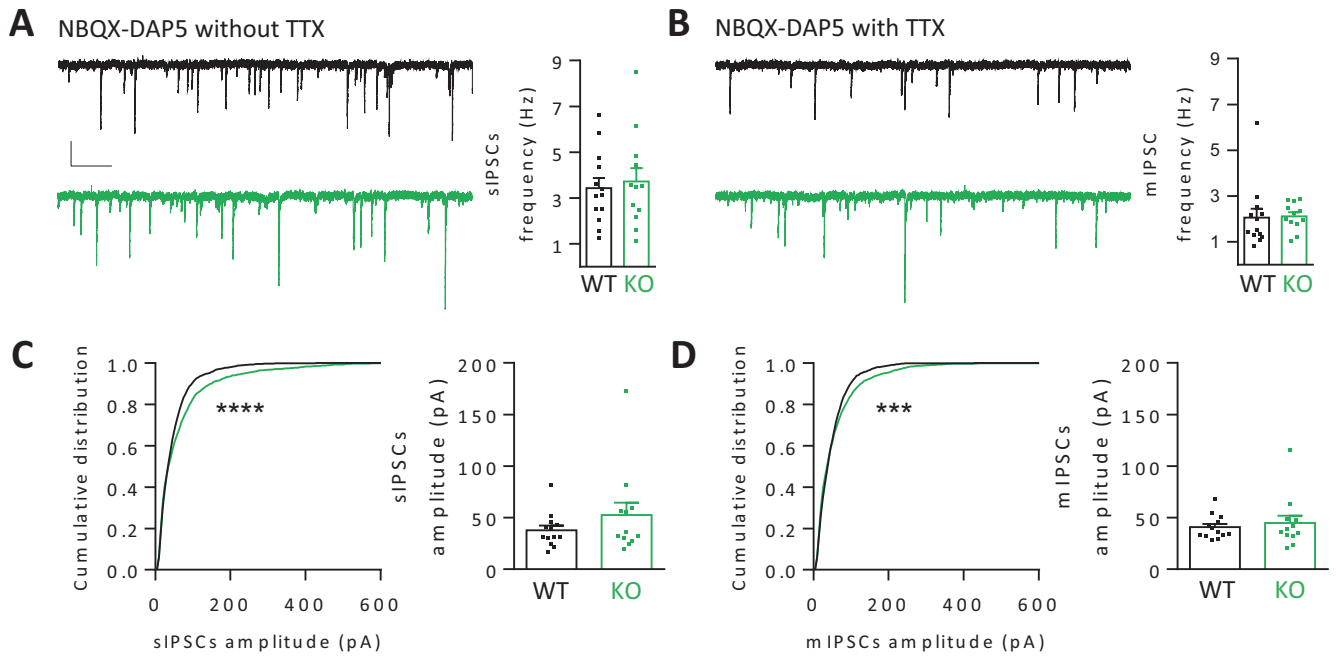


Figure 4

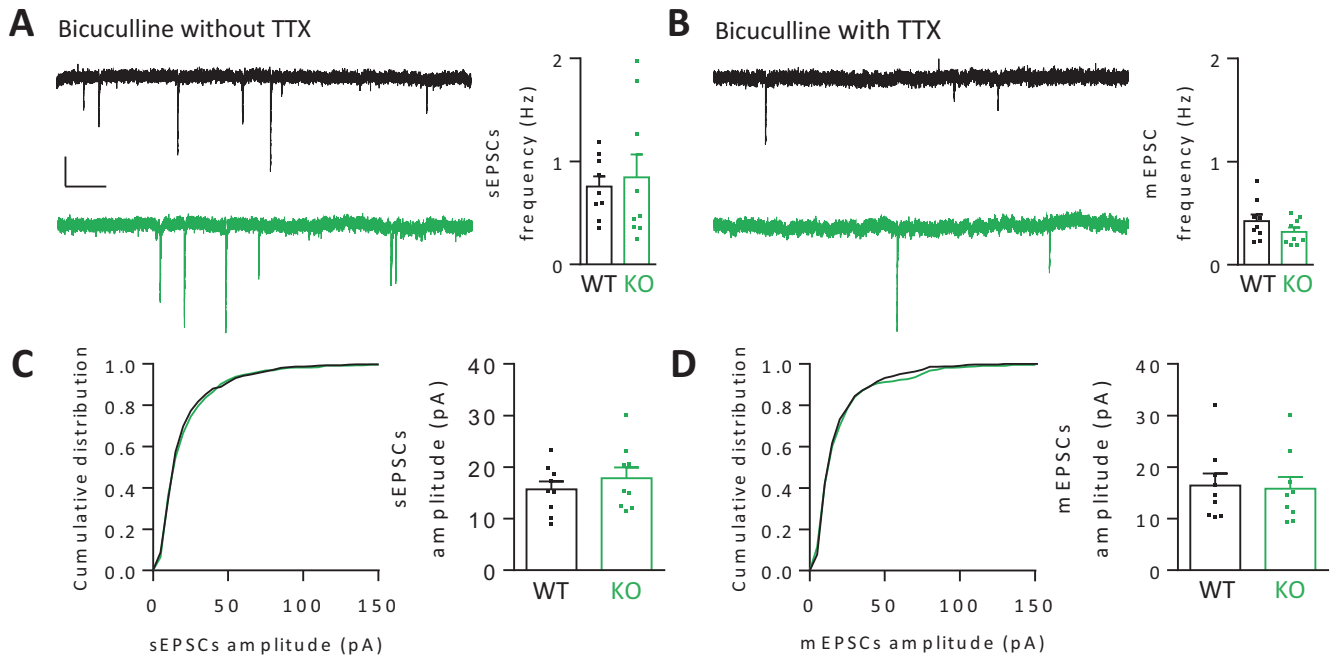


Figure 5

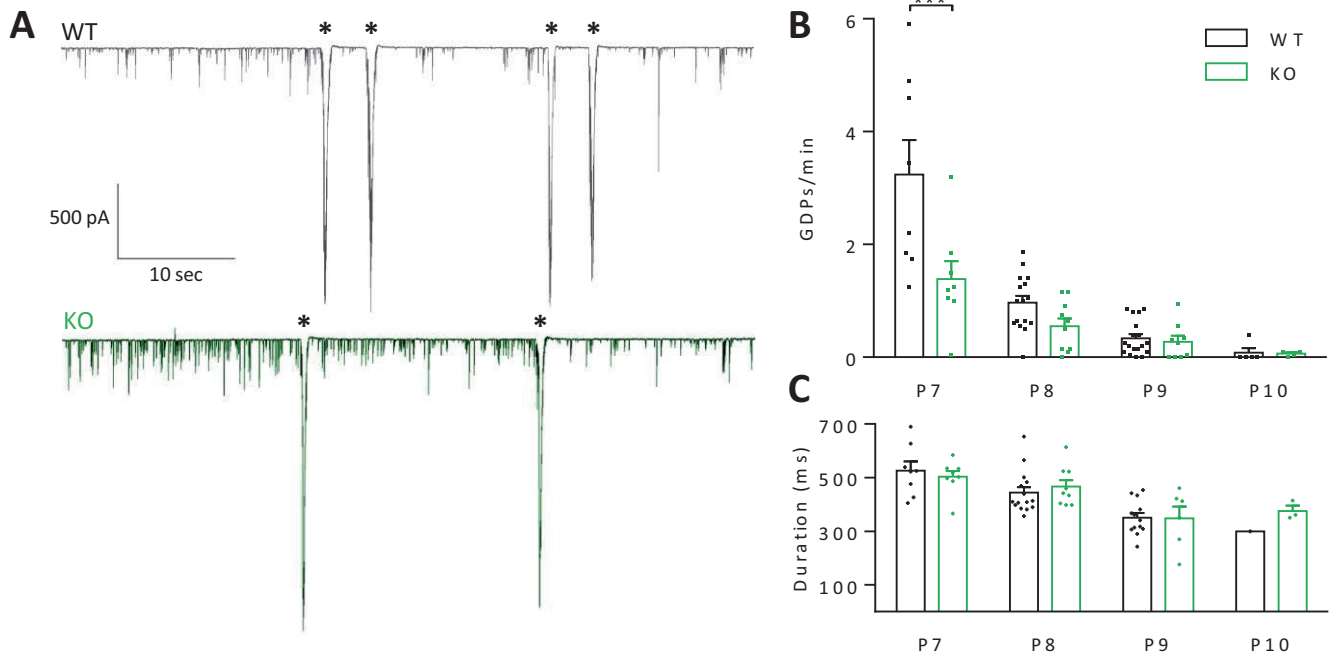


Figure 6

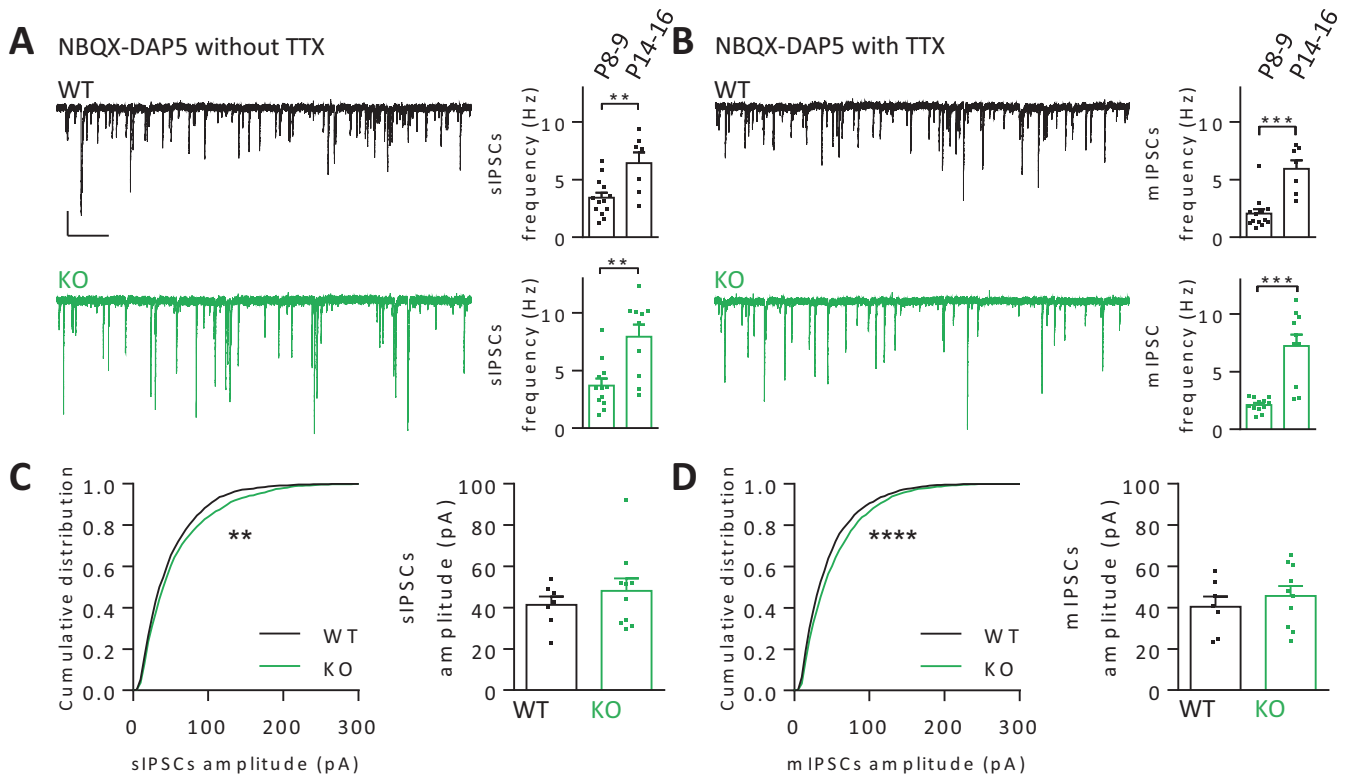


Figure 7

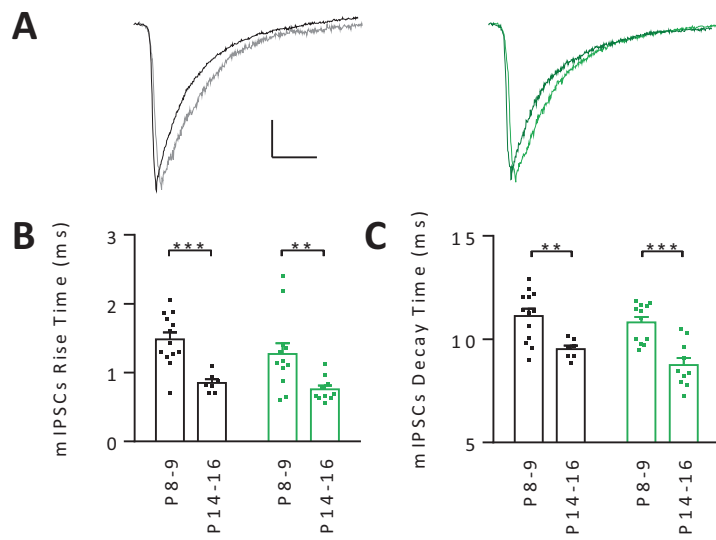


Figure 8

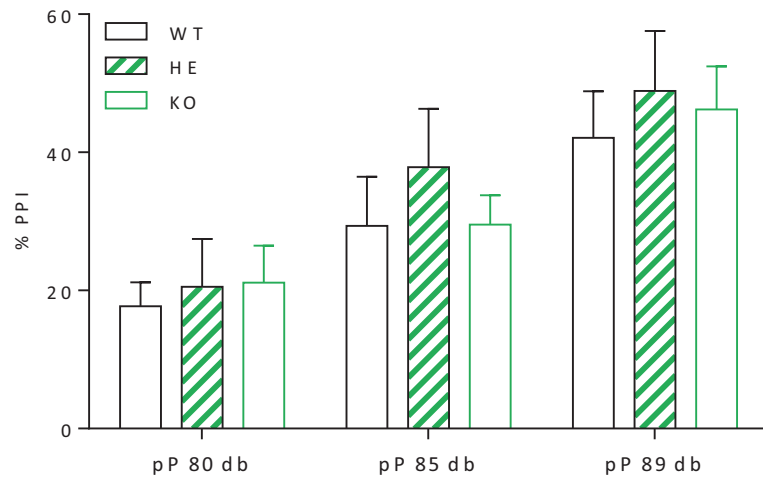


Figure 9

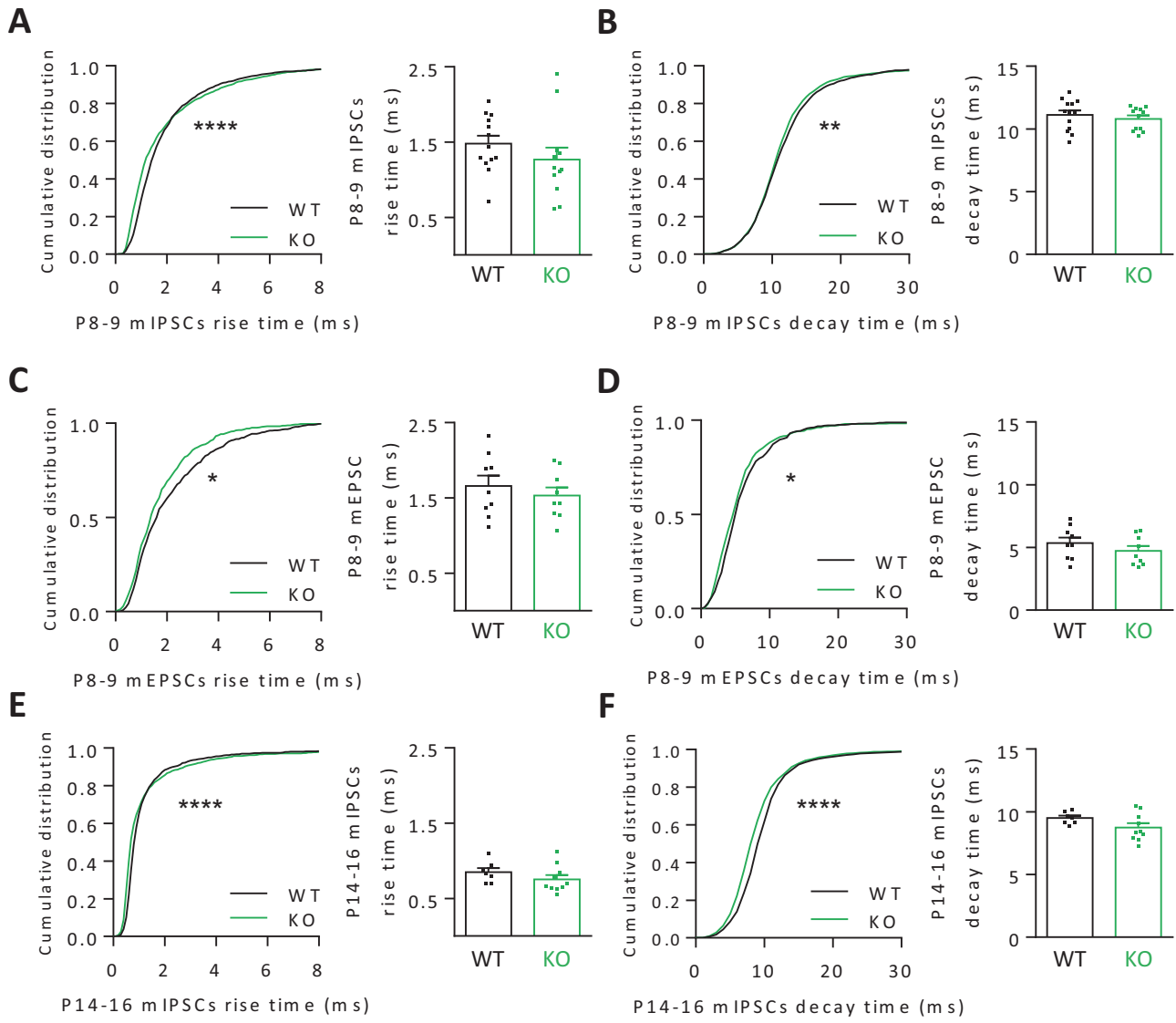
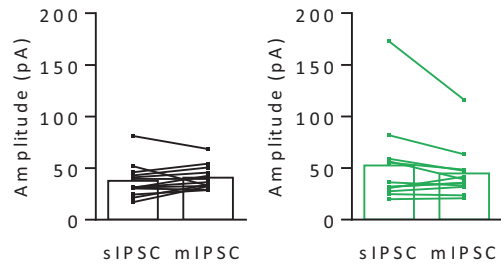
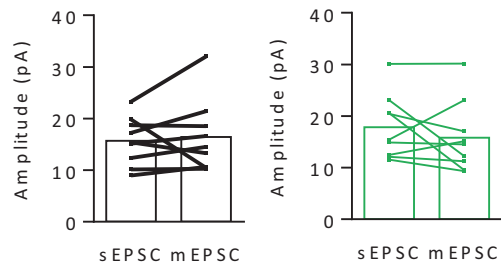


Figure S1

A P8-9 IPSCs



B P8-9 EPSCs



C P14-16 IPSCs

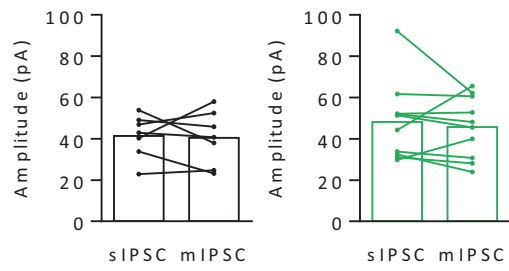


Figure S2

	P7			P9			P15		
	WT	HE	KO	WT	HE	KO	WT	HE	KO
CA1-SR	102.1 ± 17.63	96.53 ± 15.86	88.96 ± 10.03	164.0 ± 10.81	166.2 ± 16.49	141.0 ± 10.93	210.5 ± 21.00	166.6 ± 16.64	202.6 ± 14.75
CA1-SO	93.12 ± 17.11	78.09 ± 18.93	82.42 ± 8.330	170.3 ± 12.69	169.9 ± 19.53	125.2 ± 11.84	185.4 ± 15.48	159.8 ± 13.01	191.7 ± 18.84
CA3-SR	125.7 ± 16.89	92.61 ± 10.48	126.5 ± 12.58	154.5 ± 11.15	105.0 ± 11.18	110.3 ± 9.534	114.1 ± 13.56	92.95 ± 7.973	113.6 ± 12.45
CA3-SO	186.1 ± 19.44	122.1 ± 13.07	127.1 ± 8.490	149.6 ± 11.45	120.8 ± 12.47	106.3 ± 10.10	128.9 ± 14.51	144.8 ± 17.35	158.7 ± 10.04

Table 1 – Microglial density in dorsal Hippocampus of CX3CR1^{+/+} (WT), CX3CR1^{+eGFP} (HE) and CX3CR1^{eGFP/eGFP} (KO) mice

Mean value ± SEM

	Input resistance (mΩ)		Membrane capacitance (pF)		Spiking threshold (mV)		Spike amplitude (pA)	
	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO
P7	364,1 ± 37.74	358,0 ± 6.18	159,0 ± 25.18	107,8 ± 11.41	-38.76 ± 0.42	-37.76 ± 0.15	58,93 ± 2.02	61,58 ± 1.33
P8	302,2 ± 16.84	300,2 ± 21.14	153,7 ± 13.04	161,8 ± 18.32	-37.39 ± 0.83	-40.22 ± 0.65	61,75 ± 1.29	64,64 ± 1.76
P9	227,6 ± 22.37	242,1 ± 32.16	192,0 ± 36.67	186,0 ± 39.92	-39.73 ± 0.79	-39.88 ± 1.22	68,41 ± 1.91	69,16 ± 1.77
P10	222,8 ± 36.78	202,9 ± 16.25	200,4 ± 42.84	217,2 ± 45.19	-41.56 ± 2.50	-40.92 ± 1.02	65,29 ± 3.24	67,20 ± 1.58

Table 2 – Electrophysiological properties of CA3 pyramidal neurons from P7 to P10 CX3CR1^{+/+} (WT) and CX3CR1^{eGFP/eGFP} (KO) mice.

Mean value ± SEM

Figure 1 – Evolution of microglia density from birth to the end of the second postnatal week.

(A) Merge epifluorescence images of coronal sections showing DAPI (grey) and microglia staining (anti-Iba1, green) of the dorsal Hippocampus of P0, P3, P6, P9, P12 and P15 wild type mice (129sv).

(B) Subregions where microglia density was quantified: hippocampal fissure (black), strata oriens and radiatum of Ammon's Horns CA1 (blue) and CA3 (orange) and pyramidal layer (purple).

(C) Density of microglia (MG/mm²) as a function of postnatal day in different hippocampal subregions of wild type 129sv mice. N = number of animals, n = number of hippocampal slices at P0: N=3, n=11; P3: N=3, n=12; P6: N=4, n=16; P9: N=7, n=27; P12: N=4, n=16 and P15: N=3, n=11.

Figure 2 – Decreased microglial density in CA3 of CX3CR1 KO mice.

(A-C) Magnification of epifluorescence images of microglia from P7 (top), P9 (middle) and P15 (bottom) CX3CR1^{+/+} (WT) and CX3CR1^{eGFP/eGFP} (KO) mice. Measurement of the density in stratum oriens (A) and stratum radiatum (C) is based on the colocalisation of DAPI staining (blue) and microglial cellular body (green, anti-Iba1) indicated with a red arrow head.

(B-D) Quantification of microglial density in CA3 stratum oriens (B) and CA3 stratum radiatum (D) of CX3CR1^{+/+} (WT), CX3CR1^{+eGFP} (HE) and CX3CR1^{eGFP/eGFP} (KO) mice at P7 (top), P9 (middle) and P15 (bottom). Each point in histograms represents the mean density of one image.

* p<0.05, **p<0.01, 2-way ANOVA. In WT, P7: N=3, n=11; P9: N=4, n=16; P15: N=3, n=9; in HE, P7: N=2, n=6; P9: N=4, n=15; P15: N=3, n=11; in KO, P7: N=3, n=11; P9: N=4, n=18; P15: N=3, n=12.

Figure 3 – Similar intrinsic properties of CA3 pyramidal patched neurons from P7 to P10 between CX3CR1^{+/+} (WT) and CX3CR1^{eGFP/eGFP} (KO) mice.

Basic intrinsic properties of CA3 pyramidal neurons from WT (black) and KO (green) mice as function of postnatal day including (A) Input resistances (MΩ), (B) Membrane capacitances (pF), (C) Spiking threshold (mV) and (D) Amplitude of action potentials (pA). Each point represents the mean value of one cell.

Figure 4 – Subpopulation of larger GABAergic postsynaptic events in CX3CR1 deficient mice at the end of the first postnatal week.

(A) Representative traces of spontaneous GABAergic postsynaptic activity (sIPSC) recorded with NBQX (10 μ M) and DAP5 (50 μ M) in CA3 pyramidal neurons of WT (black) and CX3CR1 KO (green) P8-P9 mice, and histogram of mean frequency. Each point represents the mean frequency of a recorded cell.

(B) Representative traces and histogram of mean frequencies of miniature GABAergic postsynaptic activity (mIPSC) recorded with NBQX (10 μ M), DAP5 (50 μ M) and TTX (1 μ M) in CA3 pyramidal neurons of WT (black) and CX3CR1 KO (green) P8-P9 mice.

(C-D) Cumulative distributions of 200 random events per cell and the histogram of mean amplitudes (pA) of sIPSCs (C) and mIPSCs (D). Each point represents the median value of a recorded cell.

Scale bars correspond to 1 s (X axis) and 50 pA (Y axis). KS test for distributions *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

Figure 5 – Glutamatergic synaptic activity is not modified in CX3CR1 deficient mice at the end of the first postnatal week.

(A) Representative traces of spontaneous glutamatergic postsynaptic activity (sEPSC) recorded with Bicuculline (20 μ M) in CA3 pyramidal neurons of WT (black) and CX3CR1 KO (green) P8-P9 mice, and histogram of mean frequency. Each point represents the mean frequency of a recorded cell.

(B) Representative traces and histogram of mean frequencies of miniature glutamatergic postsynaptic activity (mEPSC) recorded with Bicuculline (20 μ M) and TTX (1 μ M) in CA3 pyramidal neurons of WT (black) and CX3CR1 KO (green) P8-P9 mice.

(C-D) Cumulative distributions of 50 random events per cell and the histogram of mean amplitudes (pA) of sEPSCs (C) and mEPSCs (D). Each point represents the median value of a recorded cell.

Scale bars correspond to 0.5 s (X axis) and 20 pA (Y axis). KS test for distributions.

Figure 6 – Network activity frequency is decreased in CX3CR1 deficient mice.

(A) Representative traces of P7 CA3 pyramidal neurons from WT (black) and CX3CR1 KO (green) mice showing the spontaneous Giant Depolarizing Potentials (GDPs signaled by an asterix).

(B) Frequency (GDPs/min) of recorded GDPs from WT (black) and KO (green) mice at P7, P8, P9 and P10.

(C) Duration (ms) of recorded GDPs in WT (black) and KO (green) mice at P7, P8, P9 and P10.

In histograms, each point represents the mean value of one cell. *** $p < 0,001$ in 2-way ANOVA.

Figure 7 – Conserved subpopulation of larger GABAergic postsynaptic events at the end of the second postnatal week in CX3CR1 deficient mice.

(A-B) Representative traces of GABAergic postsynaptic activity recorded in CA3 pyramidal neurons of P14-16 WT (black) and CX3CR1 KO (green) mice with quantitative comparison of mean frequency (Hz) between P8-9 and P14-16. Data from P8-9 are reproduced from figure 4 to allow comparison. Spontaneous activity (sIPSC, A) is recorded with NBQX (10 μ M) and DAP5 (50 μ M), miniature activity (mIPSC, B) with NBQX, DAP5 and TTX (1 μ M). Scale bars correspond to 1 s (X axis) and 50 pA (Y axis).

(C-D) Cumulative distributions of 200 random events per cell and the mean amplitudes (pA) of sIPSCs (C) and mIPSCs (D) recorded at P14-16.

In histograms, each point represents the mean frequency or the median amplitude of one cell.

** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, student t-test or KS for distribution comparison.

Figure 8 – Similar maturation of GABAergic events kinetics between the first and the second postnatal weeks in WT and CX3CR1 deficient mice.

(A) Average mIPSC traces of representative cells for WT (black) and KO (green) CA3 neurons at P8-9 (light color) and P14-16 (dark color). Scale bars correspond to 10 ms (X axis) and 10 pA (Y axis).

(B) Comparison of rise time between P8-9 and P14-16 in WT (black) and KO (green).

(C) Comparison of decay time between P8-9 and P14-16 in WT (black) and KO (green).

In all histograms, each point represents the median value of one cell. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, student t-test.

Figure 9 – No effect of CX3CR1 deletion on pre-pulse inhibition of the acoustic startle reflex.

PPI expressed as percentage of inhibition startle amplitude (% PPI).

Data are represented as mean \pm SEM with $n=8$ or 9 mice per group.

Figure S1 – Kinetics of miniature GABAergic and glutamatergic events compared between WT and CX3CR1 deficient mice.

Cumulative distribution (left) and histogram of mean values (right) of rise time(A-C) and decay time (B-D) of mIPSC (A-B) and mEPSC (C-D) at P8-P9.

Cumulative distribution (left) and histogram of mean values (right) of rise time(E) and decay time (F) of mIPSC at P15-P16. In all histograms, each point represents the median kinetic of a recorded cell.

Figure S2 – TTX has no effects on GABAergic and glutamatergic events amplitudes, suggesting no synaptic multiplicity.

Comparison of mean amplitudes (pA) between spontaneous and miniature events recorded in the same cell without or with TTX ($1 \mu\text{M}$) respectively in WT (black) and CX3CR1 KO (green) mice. Each point represents the median amplitude of one cell before and after the application of TTX.

(A) GABAergic events (mIPSCs) recorded at P8-9.

(B) Glutamatergic events (mEPSCs) recorded at P8-9.

(C) GABAergic events (mIPSCs) recorded at P14-16.

PARTIE 4 - DISCUSSION

Le travail mené au cours de cette thèse avait pour but de mieux comprendre le rôle des cellules microgliales dans le développement des circuits neuronaux de l'Hippocampe au cours de la première semaine postnatale. Nous avons plus particulièrement étudié l'impact d'un défaut de communication neurone/microglie d'une part sur la colonisation microgliale et d'autre part sur la transmission neuronale, alors principalement GABAergique et caractérisée par une synchronisation spontanée des neurones pyramidaux. Dans cette discussion, je reviendrai sur les résultats obtenus et sur leur implication au regard de la littérature.

I. La colonisation microgliale de l'Hippocampe dans la période postnatale

Le système nerveux central est un organe complexe, constitué de différentes populations cellulaires formant un ensemble fonctionnel. Parmi ces cellules, les neurones, les astrocytes ou encore les oligodendrocytes sont issues du neuroectoderme, le tissu embryonnaire conduisant à la formation du système nerveux central. A l'inverse, les microglies, ces cellules immunitaires découvertes au début du XXème siècle, proviennent non pas de l'embryon lui-même mais du sac embryonnaire et colonisent progressivement le cerveau alors en formation grâce au système sanguin (Ginhoux et al., 2010 ; Schulz et al., 2012 ; Kierdorf et al., 2013). Dans la période postnatale, leur distribution n'est pas encore « mature » et leur densité augmente de façon significative avant de diminuer chez le rongeur à partir de la troisième semaine jusqu'à atteindre une répartition relativement homogène et similaire à celle de l'adulte (Dalmau et al., 1998 ; Paolicelli et al., 2011 ; Delpech et al., 2016).

Au cours de cette étude, nous avons observée et quantifiée l'augmentation de la densité des cellules microgliales entre la naissance (P0) et la fin de la seconde semaine postnatale (P15) dans l'Hippocampe de souris de différentes souches génétiques black 6 et 129. Nous avons également pu constater que dans cette même fenêtre de temps, la microglie subit une maturation morphologique puisqu'elle passe d'une forme immature améboïde, avec un corps cellulaire volumineux et peu de processus, à une forme plus complexe avec un corps cellulaire plus petit et pourvu de nombreux prolongements de plus en plus complexes. Cette maturation est quantifiable de façon précise grâce à la mesure du volume global de la cellule et de son corps cellulaire et par le comptage du nombre de processus, la mesure de leur longueur, le comptage du nombre d'embranchements et de terminaisons.

Il est intéressant de constater que l'augmentation du nombre de microglies au cours du développement postnatal est un phénomène conservé entre différentes espèces de rongeurs, et différentes souches de souris, permettant ainsi la comparaison de données obtenues dans différentes études. Chez les deux lignées de souris black 6 et 129, les microglies sont concentrées dans cette période postnatale au niveau de la

fissure hippocampique, une zone hautement vascularisée, ce qui concorde avec le mode d'invasion de la microglie depuis la périphérie et est en accord avec de précédentes études pointant la fissure hippocampique comme un point d'entrée au cours de la colonisation de l'Hippocampe (Ashwell, 1991; Dalmau et al., 1998). A l'inverse, les microglies sont moins présentes au niveau de la couche pyramidale, certainement en raison de la forte densité des somas des neurones constituant cette couche de l'Hippocampe, la rendant quasiment imperméable à l'infiltration. Alors que la densité augmente progressivement entre P0 et P15 dans les cornes d'Ammon de l'Hippocampe chez les souris black 6, les souris 129 présentent un profil de maturation légèrement différent, avec un pic d'augmentation entre P6 et P9, suivi d'une densité relativement stable au cours de la seconde semaine postnatale. La deuxième semaine postnatale correspond chez le rongeur à la mise en place des connexions synaptiques glutamatergiques de l'Hippocampe, dont la microglie influence à la fois la sélection, par le phénomène de pruning (Stevens et al., 2007 ; Paolicelli et al., 2011 ; Schafer et al., 2012), et la maturation (Paolicelli et al., 2011 ; Hoshiko et al., 2012). La différence de colonisation entre les deux souches de souris pourrait être liée à une implication différente de la microglie dans le développement synaptique ou à différentes voies de signalisation mises en jeu dans la migration microgliale.

La distribution de la microglie au cours du développement postnatal dépend en effet de l'environnement dans lequel elle évolue. Il a par exemple été montré que dans le cortex somato-sensoriel, la distribution de la microglie correspondait à la localisation des connexions synaptiques (Hoshiko et al., 2012). Dans cette région corticale particulière associée aux moustaches du rongeur, les fibres thalamo-corticales forment des clusters en forme de tonneaux dont la microglie est initialement exclue. C'est à P6, lorsque les synapses se mettent en place, que les microglies envahissent les tonneaux. La microglie semble ainsi répondre à un signal émis par les neurones : la Fractalkine.

II. Le rôle de la Fractalkine et de son récepteur microglial CX3CR1 dans la distribution de la microglie au cours du développement postnatal

La Fractalkine est une chimiokine exprimée par les neurones au niveau de leur membrane, pouvant être libérée dans le milieu extracellulaire et dont plusieurs études ont à ce jour démontré l'influence sur la distribution des cellules microgliales au cours du développement (Paolicelli et al., 2011 ; Hoshiko et al., 2012 ; Ueno et al., 2013). Par exemple, dans le cortex somatosensoriel, l'entrée des microglies dans les structures en tonneaux est retardée d'une journée chez les souris CX3CR1^{eGFP/eGFP} dont les microglies sont dépourvues du récepteur microglial CX3CR1 à la Fractalkine, suggérant l'importance de cette voie de signalisation dans leur localisation spatio-temporelle (Hoshiko et al., 2012). Dans notre étude, nous avons montré que la

distribution des cellules microgliales des souris CX3CR1^{eGFP/eGFP} était également modifiée dans la région CA3 de l'Hippocampe dans une fenêtre temporelle similaire : à P7- P9 dans le stratum oriens et à P9 dans le stratum radiatum. Cette fenêtre temporelle correspond à la période de développement synaptique dans cette région de l'Hippocampe, à la fois glutamatergique, puisque les premières épines dendritiques apparaissent en oriens et en radiatum aux alentours de P4-P5 et augmentent jusqu'à la fin de la troisième semaine postnatale (Gaiarsa et al., 1992) et GABAergique (Marty et al., 2002). Chez les souris CX3CR1 KO, la migration des microglies alors insensibles à la Fractalkine libérée par les neurones serait perturbée, pouvant induire leur mauvaise distribution spatiale. La diminution de la densité pourrait également reposer sur un changement des propriétés des cellules microgliales dépourvues du récepteurs CX3CR1, dont le défaut de migration a déjà été mis en évidence (Liang et al., 2009 ; Pagani et al., 2015).

Comme dans le cortex somato-sensoriel, l'altération est transitoire, puisque dans notre modèle les souris KO présentent la même densité à P15 que les souris de type sauvage. Cet effet transitoire pourrait être dû au fait que la voie de signalisation fractalkine n'est pas le seul signal guidant la migration des cellules microgliales au cours du développement. Cette voie de signalisation pourrait être particulièrement impliquée à une étape précise du développement de l'Hippocampe puis laisser la place à d'autres signaux comme les cytokines ou l'ATP. Il pourrait également s'agir d'un phénomène de compensation mis en place chez les souris CX3CR1 KO, avec l'apparition d'une nouvelle voie de signalisation ou le renforcement d'une voie normalement auxiliaire.

De façon inattendue, nous n'observons pas de réduction similaire en CA1, contrairement à ce qui avait été montré dans une autre étude où la densité microgliale était réduite dans le stratum radiatum de CA1 de P8 à P28 (Paolicelli et al., 2011). Cette différence pourrait être d'ordre technique, notre méthode de quantification à partir d'acquisition en épifluorescence ne nous permettant peut-être pas d'observer une légère différence. Cependant, cette explication reste peu probable car notre étude de la densité microgliale se fait à l'échelle d'une sous-région entière et non d'une portion de celle-ci. La divergence des résultats pourrait également correspondre à une variabilité entre différentes souches de souris. En effet, nos souris étant de fond génétique 129, nous avons vu précédemment que la distribution des microglies pouvait y être légèrement différente de celle observée chez les souris black 6, utilisées dans l'étude de Paolicelli. Chez les souris 129, la Fractalkine pourrait avoir moins d'influence en CA1 qu'en CA3, soit parce qu'elle ne serait pas libérée en quantité homogène dans les deux régions, soit parce que la microglie n'y serait pas réceptive de la même façon. Ceci suggérerait la présence de populations hétérogènes de microglies, peut-être à différents stades de maturation avec un profil génétique inégal.

Malgré les divergences, nos résultats confirment la mise en jeu de la voie de signalisation Fractalkine/CX3CR1 entre neurones et microglies et son importance pour la colonisation microgliale au cours du développement postnatal.

III. Le rôle des microglies dans le remodelage synaptique

Le développement des connexions synaptiques se caractérise par une période d'intense synaptogénèse suivie de la suppression des synapses surnuméraires à laquelle participe la microglie au travers du pruning. Ce phénomène de phagocytose localisée vise notamment les éléments présynaptiques et les épines dendritiques de façon dépendante de la voie de signalisation C3 et de son récepteur CR3 (Paolicelli et al., 2011 ; Schafer et al., 2012). Nous avons mis en évidence au cours de cette étude, que la voie de signalisation Fractalkine/CX3CR1 n'avait pas d'impact sur le remodelage synaptique GABAergique des neurones pyramidaux de CA3 au cours du développement postnatal.

En effet, la fréquence des événements liés à la transmission GABAergique, spontanée comme miniature (sIPSCs et mIPSCs), est similaire à P8-9 chez les souris de type sauvage et CX3CR1 KO, suggérant un nombre identique de synapses. La fréquence des courants synaptiques excitateurs médiés par le Glutamate n'étant pas non plus affectée en CA3 par la délétion du récepteur CX3CR1 dans cette fenêtre temporelle, nous avons émis l'hypothèse que le remodelage pouvait avoir lieu plus tard, au cours de la deuxième semaine postnatale comme démontré sur les épines dendritiques dans la région CA1 (Paolicelli et al., 2011). Or, la fréquence des sIPSCs et mIPSCs n'est pas non plus affectée à la fin de la deuxième semaine postnatale (P14-16). Ces résultats suggèrent que la microglie ne jouerait pas le même rôle dans le développement des synapses excitatrices et inhibitrices. L'hypothèse la plus évidente pour expliquer cette différence vient de la forme même des différentes synapses. En effet, contrairement aux synapses glutamatergiques localisées au niveau de petites excroissances dendritiques, les épines, les synapses GABAergiques sont majoritairement présentes sur le soma des neurones pyramidaux ou directement sur l'arbre dendritique ou axonal. Cette construction particulière ne permet peut-être pas aux microglies de venir sectionner et phagocyter la synapse.

Cependant, il ne peut être exclu que la divergence des résultats obtenus dépende d'une spécification régionale. La microglie pourrait jouer un rôle légèrement différent en CA3 qu'en CA1, possiblement en raison de connectivités afférentes spécifiques ou d'un environnement cellulaire et moléculaire différent. Enfin, la variabilité pourrait également être due au fond génétique différent des souris. Il a par exemple été montré que les épines dendritiques en CA1 étaient plus courtes chez les souris 129 comparées aux souris black6, ce qui pourrait sous-tendre un phénomène de pruning microglial moins prononcé (Routh et al., 2009).

IV. L'influence de la microglie sur la transmission synaptique GABAergique

En complément de son implication dans le remodelage postnatal des synapses excitatrices, il a été montré que la microglie pouvait influencer la transmission neuronale au cours du développement (Paolicelli et al., 2011; Hoshiko et al., 2012). La délétion du récepteur CX3CR1 a notamment pour effet d'altérer la maturation du signal glutamatergique en ralentissant l'augmentation de la composition AMPA de la transmission (Hoshiko et al., 2012). De même, la transition des sous-unités GluN2B vers GluN2A des récepteurs NMDA est réduite chez les souris CX3CR1 KO. Cette maturation du signal pourrait refléter l'élimination des synapses immatures. Elle pourrait également être due à la libération de facteurs microgliaux stimulant directement la maturation synaptique, comme le BDNF qui facilite la formation de nouvelles synapses au cours de l'apprentissage chez l'adulte (Parkhurst et al., 2013), ou le TNF- α , l'IL-1 β et le TGF β 2 augmentant l'expression des récepteurs AMPA à la membrane (Beattie et al., 2002 ; Lai et al., 2006 ; Bae et al., 2011).

Cependant, l'ensemble de ces données mettent en évidence un rôle microglial dans la maturation du signal spécifiquement glutamatergique. Or, nous avons montré au cours de notre étude, que la délétion du récepteur CX3CR1 avait également un effet sur la transmission GABAergique. En effet, alors que l'amplitude et les cinétiques moyennes des mIPSCs ne sont pas modifiées, la distribution des événements révèlent une proportion plus importante d'événements GABAergiques plus rapides et de plus grande amplitude chez les souris KO. Cette altération observée à P8-9 est maintenue dans le développement à P14-16. Selon une première hypothèse, ces événements plus amples pourraient refléter une immaturité des synapses GABAergiques, dont on attend une diminution de l'amplitude des courants au cours de la période postnatale (Cohen et al., 2000). Cependant, la diminution de l'amplitude est corrélée au cours du développement postnatal avec une diminution des cinétiques de montée et de décroissance, c'est-à-dire à des événements plus rapides (Cohen et al., 2000). La présence de synapses GABAergiques immatures dans notre modèle devrait donc produire des événements plus amples et plus lents, ce qui n'est pas le cas. Ce paradoxe nous mène vers une seconde hypothèse, impliquant la mise en jeu de différentes populations d'interneurones.

En effet, les événements plus amples et plus rapides que nous observons chez les souris KO pourrait être dus à une proportion plus importante de synapses issues d'interneurones à décharge rapide comme les cellules en panier exprimant la parvalbumine. Cette hypothèse est soutenue par l'étude de Squarzoni et al., qui ont mis en évidence l'influence des cellules microgliales, et notamment la voie de signalisation Fractalkine/CX3CR1, sur la distribution des interneurones spécifiquement parvalbuminergiques au cours du développement embryonnaire et postnatal (Squarzoni et al., 2014). Ainsi, chez nos souris CX3CR1 KO, les

interneurones à décharge rapide pourraient être plus nombreux ou différemment distribués au niveau de CA3 et avoir par conséquent un impact plus important sur la transmission GABAergique dans cette région.

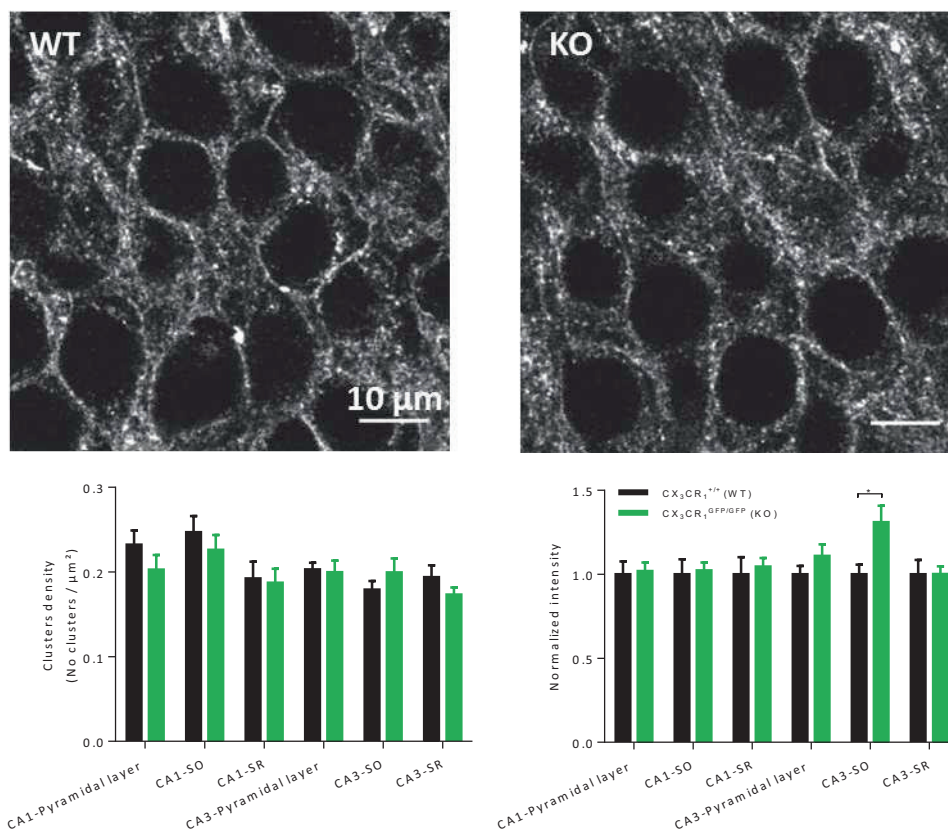
V. La modulation de l'activité de réseau par les microglies

L'Hippocampe, et plus particulièrement la région CA3, est caractérisée au cours de la période postnatale par la production d'une activité de réseau spécifique : les GDPs (Ben-Ari et al., 1989). Ces événements de synchronisation spontanée sont importants pour le renforcement synaptique et la formation des réseaux neuronaux adéquats (Kasyanov et al., 2004 ; Mohajerani and Cherubini, 2006 ; Mohajerani et al., 2007 ; Ben-Ari et al., 2012). Par exemple, dans le contexte de l'autisme, un désordre neuropsychiatrique défini par des défauts de connectivité et un déséquilibre de la balance excitation/inhibition de la transmission synaptique, des modèles animaux présentent une altération de la fréquence d'apparition des GDPs (Pizzarelli and Cherubini, 2013; Cellot et al., 2016). Dans notre étude, nous avons montré une perturbation similaire des GDPs dont la fréquence est diminuée de moitié chez les souris CX3CR1 KO à la fin de la première semaine postnatale (P7). Cette altération est cohérente avec la connectivité interrégionale réduite et l'émergence de symptômes caractéristiques de l'autisme observée chez la souris CX3CR1 KO, comme la diminution des interactions sociales et l'augmentation des comportements répétitifs (Zhan et al., 2014).

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'impact de la délétion CX3CR1 sur la fréquence des GDPs. La première repose sur la libération d'un modulateur connu de l'activité de réseau par les microglies : le BDNF (Ferrini and De Koninck, 2013). Chez l'adulte en condition pathologiques, ce facteur a pour effet de diminuer l'expression du transporteur au chlore KCC2 et par conséquent de diminuer la concentration intracellulaire en chlore ainsi que l'effet inhibiteur du GABA (Coull et al., 2005). A l'inverse, l'inactivation du transporteur NKCC1 responsable de l'effet excitateur du GABA au cours du développement, diminue la fréquence des GDPs (Allene et al., 2012). Le ratio KCC2/NKCC1 constitue donc un critère déterminant pour la génération des GDPs. Chez les souris CX3CR1 KO, la diminution de la densité microgliale observée en CA3 à P7 pourrait induire la réduction de la libération de BDNF et par conséquent un ratio KCC2/NKCC1 augmenté, diminuant ainsi la fréquence des GDPs.

Afin d'explorer cette piste, nous avons procédé au marquage immunohistochimique du transporteur KCC2 permettant la mesure de son expression relative dans l'Hippocampe de souris de type sauvage et CX3CR1 KO. Les résultats préliminaires obtenus à 9 jours postnataux, ne présentent aucune modification de la densité des clusters formés par la pompe KCC2, dans aucune région de l'Hippocampe, mais une augmentation de l'intensité du marquage dans le stratum oriens de CA3 chez les souris CX3CR1 KO. Ces résultats préliminaires pourraient supporter l'hypothèse d'une expression augmentée de KCC2 menant à un

effet moins excitateur du neurotransmetteur GABA et par conséquent à la diminution de la fréquence des GDPs, mais demandent une investigation plus profonde.



Résultats préliminaires comparant les marquages immunohistochimiques de la pompe KCC2 chez les souris de type sauvage (WT) ou CX3CR1 KO (KO). Les images ont été acquises en microscopie confocale. Les graphes correspondent à la densité des clusters (nombre de clusters par µm², à gauche) et à l'intensité normalisée du marquage (à droite) dans différentes régions de l'Hippocampe.

WT : n=8, KO n=6. * p<0.05 selon le test de student.

La seconde hypothèse repose sur la modification de la distribution des interneurones à décharge rapide, suggérée par l'étude de l'activité synaptique. En effet, les GDPs sont initiés dans la période postnatale par des interneurones assemblés en « hub » (Bonifazi et al., 2009 ; Picardo et al., 2011 ; Allene et al., 2012 ; Villette et al., 2016). Ces noyaux d'interneurones hyperconnectés contiennent à la fois des cellules en panier exprimant la parvalbumine et des interneurones à projection lointaine exprimant la somatostatine. Une perturbation de la distribution des interneurones à décharge rapide (parvalbumine) pourrait donc modifier la constitution du réseau et ainsi expliquer un changement de fréquence des GDPs. Afin d'explorer cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser un marquage immunohistochimique de différentes populations d'interneurones et de caractériser leur présence et leur distribution dans l'Hippocampe selon la délétion ou non de la voie de communication Fractalkine/CX3CR1.

Une autre explication à la diminution de la fréquence des GDPs que nous observons pourrait également être liée à une modification des caractéristiques intrinsèques des interneurons du hub, peut-être une excitabilité réduite induisant une diminution des événements de dépolarisation spontanée. L'étude des activités de réseaux de CA3, incluant les GDPs mais également les événements calciques SPAs, ainsi que l'évaluation des propriétés électrophysiologiques intrinsèques des interneurons au cours des premiers jours postnataux, avant que la densité microgliale ne soit affectée par la délétion du récepteur CX3CR1, constituerait une piste à explorer intéressante.

VI. Les souris CX3CR1^{eGFP/eGFP}, des souris schizophrènes ?

Alors que l'altération de l'activité de réseau immature observée en CA3 au cours de cette étude est cohérente avec une connectivité réduite et l'émergence de symptômes autistiques chez la souris CX3CR1 KO adulte, de plus en plus de données suggèrent également l'implication d'un phénomène inflammatoire et de la microglie dans le développement de la schizophrénie (Müller et al., 2015 ; Weickert and Weickert, 2016). De plus, notre fenêtre d'étude en fin de première semaine postnatale semble correspondre à une fenêtre critique dans le développement de la schizophrénie. L'un des modèles classiques mis au point pour tester les hypothèses sur l'origine de la maladie repose notamment sur une lésion néonatale de l'Hippocampe ventral de rats par injection d'acide iboténique à 7 jours postnataux (Tseng et al., 2009). L'importance de cette exacte fenêtre temporelle dans l'émergence de la maladie, a été confirmé par l'apparition de perturbations comportementales caractéristiques de la schizophrénie, chez des rats dont les cellules microgliales de l'Hippocampe ont été activées par injection locale de LPS à 7 jours postnataux (Zhu et al., 2014). Cette étude, met également en évidence les conséquences d'une altération de la fonction microgliale au cours du développement postnatal sur l'émergence de la maladie.

Afin de tester cette hypothèse par une première approche, nous avons soumis des souris de type sauvage ou mutées CX3CR1^{+/eGFP} et CX3CR1^{eGFP/eGFP} à un test comportemental classique permettant de mettre en évidence des symptômes de la schizophrénie : le test de PPI (pre-pulse inhibition). Ce test repose sur le comportement naturel du rongeur à sursauter lorsqu'il est soumis à un stimulus sonore de forte intensité. Lorsque ce stimulus est précédé d'un stimulus de faible intensité, la réaction du rongeur diminue. Chez les patients schizophrènes comme chez les modèles animaux de schizophrénie, cette inhibition par le pré-stimulus est réduite. Au cours de notre étude, nous n'avons observé aucune différence de réaction de sursaut chez les animaux de type sauvage ou CX3CR1 KO et HE. Ces résultats ne nous permettent donc pas de supporter un rôle de la microglie et de la voie de signalisation Fractalkine/CX3CR1 dans l'apparition de symptômes positifs liés à la physiopathologie de la schizophrénie.

VII. Perspectives

Au cours de cette étude, nous avons montré que la microglie joue un rôle dans le développement de la transmission synaptique GABAergique et influence de façon significative l'activité de réseau caractéristique de CA3 dans la période postnatale, ce qui pourrait avoir un impact majeur sur la connectivité de l'Hippocampe. Cependant, les mécanismes qui sous-tendent la fonction exacte de la microglie dans ce contexte restent encore à élucider. Il serait notamment intéressant de compléter ces travaux par l'étude immunohistochimique de la distribution des différentes populations d'interneurones suite à la suppression de la voie de communication Fractalkine/CX3CR1.

De même, différencier le rôle de l'interaction neurone-microglie sur la formation des réseaux au cours du développement, de son implication en temps réel dans la transmission synaptique constitue un enjeu futur majeur. Cependant, cette perspective nécessite encore à ce jour la mise au point de nouvelles méthodes d'altération inductible de la communication neurone-microglie.

Par ailleurs, l'implication de la microglie dans la physiopathologie de la schizophrénie présente un intérêt grandissant. Il a par exemple été montré qu'une activation des cellules microgliales par l'injection de LPS dans l'Hippocampe à la fin de la première semaine postnatale induit l'apparition de symptômes assimilables à la schizophrénie. L'étude de la microglie dans un modèle animal reconnu de la schizophrénie permettrait de mettre en évidence son implication dans l'apparition de la maladie. Un nombre conséquent de modèles développementaux ont été générés afin de tester les hypothèses sur l'origine de la maladie. Ces modèles miment une grande partie des caractéristiques neurobiologiques et cliniques de la schizophrénie et ouvrent des perspectives dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Parmi ces modèles, le modèle MAM est un modèle robuste qui consiste à injecter une rate à 17 jours de gestation avec un antimétabolite, le méthylxanthozyméthanol, altérant ainsi la neurogénèse (Lodge and Grace, 2009). Les rats issus de cette portée présentent dès l'adolescence des symptômes de type schizophréniques et des altérations histologiques au niveau de l'Hippocampe similaires à celle observées post mortem chez les patients atteints de schizophrénie (Lodge, 2013). Dans ce modèle, il serait intéressant d'étudier au cours du développement postnatal, d'une part la distribution et la morphologie des cellules microgliales et d'autre part la transmission synaptique (notamment GABAergique) et l'activité de réseau de l'Hippocampe (GDPs).

Références

- Acsády, L., Arabadzisz, D., and Freund, T.F. (1996a). Correlated morphological and neurochemical features identify different subsets of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience* *73*, 299–315.
- Acsády, L., Görcs, T.J., and Freund, T.F. (1996b). Different populations of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons are specialized to control pyramidal cells or interneurons in the hippocampus. *Neuroscience* *73*, 317–334.
- Allene, C., Picardo, M.A., Becq, H., Miyoshi, G., Fishell, G., and Cossart, R. (2012). Dynamic changes in interneuron morpho-physiological properties mark the maturation of hippocampal network activity. *J. Neurosci.* *32*, 6688.
- Alonso, A., and Köhler, C. (1982). Evidence for separate projections of hippocampal pyramidal and non-pyramidal neurons to different parts of the septum in the rat brain. *Neurosci. Lett.* *31*, 209–214.
- Alonso, A., and Köhler, C. (1984). A study of the reciprocal connections between the septum and the entorhinal area using anterograde and retrograde axonal transport methods in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* *225*, 327–343.
- Altman, J., and Bayer, S.A. (1990a). Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. *J. Comp. Neurol.* *301*, 325–342.
- Altman, J., and Bayer, S.A. (1990b). Prolonged sojourn of developing pyramidal cells in the intermediate zone of the hippocampus and their settling in the stratum pyramidale. *J. Comp. Neurol.* *301*, 343–364.
- Altman, J., and Bayer, S.A. (1990c). Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J. Comp. Neurol.* *301*, 365–381.
- Amaral, D.G., and Cowan, W.M. (1980). Subcortical afferents to the hippocampal formation in the monkey. *J. Comp. Neurol.* *189*, 573–591.
- Amaral, D.G., and Dent, J.A. (1981). Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J. Comp. Neurol.* *195*, 51–86.
- Amaral, D.G., Insausti, R., and Cowan, W.M. (1984). The commissural connections of the monkey hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.* *224*, 307–336.
- Anderson, S.A., Eisenstat, D.D., Shi, L., and Rubenstein, J.L. (1997). Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* *278*, 474–476.
- Antony, J.M., Paquin, A., Nutt, S.L., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2011). Endogenous microglia regulate development of embryonic cortical precursor cells. *J. Neurosci. Res.* *89*, 286–298.
- Aredo, B., Zhang, K., Chen, X., Wang, C.X.-Z., Li, T., and Ufret-Vincenty, R.L. (2015). Differences in the distribution, phenotype and gene expression of subretinal microglia/macrophages in C57BL/6N (Crb1 rd8/rd8) versus C57BL6/J (Crb1 wt/wt) mice. *J. Neuroinflammation* *12*, 1.
- Arnò, B., Grassivaro, F., Rossi, C., Bergamaschi, A., Castiglioni, V., Furlan, R., Greter, M., Favaro, R., Comi, G., Becher, B., et al. (2014). Neural progenitor cells orchestrate microglia migration and positioning into the developing cortex. *Nat. Commun.* *5*, 5611.

- Arnold, T., and Betsholtz, C. (2013). The importance of microglia in the development of the vasculature in the central nervous system. *Vasc. Cell* 5, 4.
- Arnoux, I., Hoshiko, M., Mandavy, L., Avignone, E., Yamamoto, N., and Audinat, E. (2013). Adaptive phenotype of microglial cells during the normal postnatal development of the somatosensory "Barrel" cortex. *Glia* 61, 1582–1594.
- Arnoux, I., Audinat, E., Arnoux, I., and Audinat, E. (2015). Fractalkine Signaling and Microglia Functions in the Developing Brain, Fractalkine Signaling and Microglia Functions in the Developing Brain. *Neural Plast. Neural Plast.* 2015, 2015, e689404.
- Ashwell, K. (1991). The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 58, 1–12.
- Avignone, E., Ulmann, L., Levavasseur, F., Rassendren, F., and Audinat, E. (2008). Status epilepticus induces a particular microglial activation state characterized by enhanced purinergic signaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 9133–9144.
- Bae, J.J., Xiang, Y.-Y., Martinez-Canabal, A., Frankland, P.W., Yang, B.B., and Lu, W.-Y. (2011). Increased transforming growth factor- β 1 modulates glutamate receptor expression in the hippocampus. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 3, 9–20.
- Banks, M.I., Li, T.B., and Pearce, R.A. (1998). The synaptic basis of GABA_A,slow. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 1305–1317.
- Bannerman, D.M., Good, M.A., Butcher, S.P., Ramsay, M., and Morris, R.G. (1995). Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. *Nature* 378, 182–186.
- Barclay, A.N., Wright, G.J., Brooke, G., and Brown, M.H. (2002). CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol.* 23, 285–290.
- Bauman, M.D., Iosif, A.-M., Smith, S.E.P., Bregere, C., Amaral, D.G., and Patterson, P.H. (2014). Activation of the Maternal Immune System During Pregnancy Alters Behavioral Development of Rhesus Monkey Offspring. *Biol. Psychiatry* 75, 332–341.
- Bayer, S.A. (1980). Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. *J. Comp. Neurol.* 190, 87–114.
- Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlotnik, A., and Schall, T.J. (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385, 640–644.
- Beattie, E.C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J.C., Ha, B.K., Zastrow, M.V., Beattie, M.S., and Malenka, R.C. (2002). Control of Synaptic Strength by Glial TNF α . *Science* 295, 2282–2285.
- Beck, A., Penner, R., and Fleig, A. (2008). Lipopolysaccharide-induced down-regulation of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ currents (ICRAC) but not Ca²⁺-activated TRPM4-like currents (ICAN) in cultured mouse microglial cells. *J. Physiol.* 586, 427–439.
- Beckstead, R.M. (1978). Afferent connections of the entorhinal area in the rat as demonstrated by retrograde cell-labeling with horseradish peroxidase. *Brain Res.* 152, 249–264.
- Ben-Ari, Y. (2001). Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci.* 24, 353–360.

- Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* *3*, 728–739.
- Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R., and Gaiarsa, J.L. (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J. Physiol.* *416*, 303.
- Ben-Ari, Y., Khalilov, I., Kahle, K.T., and Cherubini, E. (2012). The GABA Excitatory/Inhibitory Shift in Brain Maturation and Neurological Disorders. *The Neuroscientist* *18*, 467–486.
- Benarroch, E.E. (2013). Microglia: Multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury. *Neurology* *81*, 1079–1088.
- Benes, F.M. (2000). Emerging principles of altered neural circuitry in schizophrenia. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *31*, 251–269.
- Benes, F.M. (2007). Searching for unique endophenotypes for schizophrenia and bipolar disorder within neural circuits and their molecular regulatory mechanisms. *Schizophr. Bull.* *33*, 932–936.
- Benes, F.M., Lim, B., Matzilevich, D., Walsh, J.P., Subburaju, S., and Minns, M. (2007). Regulation of the GABA cell phenotype in hippocampus of schizophrenics and bipolars. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 10164–10169.
- Berbel, P., and Innocenti, G.M. (1988). The development of the corpus callosum in cats: A light- and electron-microscopic study. *J. Comp. Neurol.* *276*, 132–156.
- Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J., and Gassmann, M. (2004). Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol. Rev.* *84*, 835–867.
- Bialas, A.R., and Stevens, B. (2013). TGF- β Signaling Regulates Neuronal C1q Expression and Developmental Synaptic Refinement. *Nat. Neurosci.* *16*, 1773–1782.
- Biber, K., Neumann, H., Inoue, K., and Boddeke, H.W.G.M. (2007). Neuronal “On” and “Off” signals control microglia. *Trends Neurosci.* *30*, 596–602.
- Bilbo, S.D., Levkoff, L.H., Mahoney, J.H., Watkins, L.R., Rudy, J.W., and Maier, S.F. (2005). Neonatal Infection Induces Memory Impairments Following an Immune Challenge in Adulthood. *Behav. Neurosci.* *119*, 293–301.
- Bilbo, S.D., Barrientos, R.M., Eads, A.S., Northcutt, A., Watkins, L.R., Rudy, J.W., and Maier, S.F. (2008). Early-life infection leads to altered BDNF and IL-1 β mRNA expression in rat hippocampus following learning in adulthood. *Brain. Behav. Immun.* *22*, 451–455.
- Bir, S.C., Ambekar, S., Kukreja, S., and Nanda, A. (2015). Julius Caesar Arantius (Giulio Cesare Aranzi, 1530–1589) and the hippocampus of the human brain: history behind the discovery. *J. Neurosurg.* *122*, 971–975.
- Blinzinger, K., and Kreutzberg, G. (1968). Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z. Für Zellforsch. Mikrosk. Anat. Vienna Austria* *1948* *85*, 145–157.
- Block, M.L., Zecca, L., and Hong, J.-S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 57–69.
- Boche, D., Cunningham, C., Docagne, F., Scott, H., and Perry, V.H. (2006). TGF β 1 regulates the inflammatory response during chronic neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* *22*, 638–650.

- Boehme, S.A., Lio, F.M., Maciejewski-Lenoir, D., Bacon, K.B., and Conlon, P.J. (2000). The chemokine fractalkine inhibits Fas-mediated cell death of brain microglia. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *165*, 397–403.
- Boekhoff, T.M.A., Ensinger, E.-M., Carlson, R., Bock, P., Baumgärtner, W., Rohn, K., Tipold, A., and Stein, V.M. (2012). Microglial contribution to secondary injury evaluated in a large animal model of human spinal cord trauma. *J. Neurotrauma* *29*, 1000–1011.
- Bonifazi, P., Goldin, M., Picardo, M.A., Jorquera, I., Cattani, A., Bianconi, G., Represa, A., Ben-Ari, Y., and Cossart, R. (2009). GABAergic hub neurons orchestrate synchrony in developing hippocampal networks. *Science* *326*, 1419–1424.
- Booth, P.L., and Thomas, W.E. (1991). Evidence for motility and pinocytosis in ramified microglia in tissue culture. *Brain Res.* *548*, 163–171.
- Boucsein, C., Kettenmann, H., and Nolte, C. (2000). Electrophysiological properties of microglial cells in normal and pathologic rat brain slices. *Eur. J. Neurosci.* *12*, 2049–2058.
- Boucsein, C., Zacharias, R., Färber, K., Pavlovic, S., Hanisch, U.-K., and Kettenmann, H. (2003). Purinergic receptors on microglial cells: functional expression in acute brain slices and modulation of microglial activation *in vitro*: Purinergic receptors of microglia. *Eur. J. Neurosci.* *17*, 2267–2276.
- Brockhaus, J., Möller, T., and Kettenmann, H. (1996). Phagocytosing ameboid microglial cells studied in a mouse corpus callosum slice preparation. *Glia* *16*, 81–90.
- Broderick, C., Duncan, L., Taylor, N., and Dick, A.D. (2000). IFN-gamma and LPS-mediated IL-10-dependent suppression of retinal microglial activation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *41*, 2613–2622.
- Brooke, G., Holbrook, J.D., Brown, M.H., and Barclay, A.N. (2004). Human Lymphocytes Interact Directly with CD47 through a Novel Member of the Signal Regulatory Protein (SIRP) Family. *J. Immunol.* *173*, 2562–2570.
- Brown, G.C., and Neher, J.J. (2014). Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* *15*, 209–216.
- Buhl, E.H., Halasy, K., and Somogyi, P. (1994). Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature* *368*, 823–828.
- Butt, S.J.B., Fuccillo, M., Nery, S., Noctor, S., Kriegstein, A., Corbin, J.G., and Fishell, G. (2005). The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron* *48*, 591–604.
- Cain, D.P., Saucier, D., Hall, J., Hargreaves, E.L., and Boon, F. (1996). Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under APV or CNQX: contribution of sensorimotor disturbances to drug-induced acquisition deficits. *Behav. Neurosci.* *110*, 86–102.
- Calderon de Anda, F., Gärtner, A., Tsai, L.-H., and Dotti, C.G. (2008). Pyramidal neuron polarity axis is defined at the bipolar stage. *J. Cell Sci.* *121*, 178–185.
- Cardona, A.E., Pioro, E.P., Sasse, M.E., Kostenko, V., Cardona, S.M., Dijkstra, I.M., Huang, D., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R., et al. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat. Neurosci.* *9*, 917–924.
- Casano, A.M., Albert, M., and Peri, F. (2016). Developmental Apoptosis Mediates Entry and Positioning of Microglia in the Zebrafish Brain. *Cell Rep.* *16*, 897–906.

- Cellot, G., Maggi, L., Castro, M.A.D., Catalano, M., Migliore, R., Migliore, M., Scattoni, M.L., Calamandrei, G., and Cherubini, E. (2016). Premature changes in neuronal excitability account for hippocampal network impairment and autistic-like behavior in neonatal BTBR T+tf/J mice. *Sci. Rep.* 6.
- Chamak, B., Morandi, V., and Mallat, M. (1994). Brain macrophages stimulate neurite growth and regeneration by secreting thrombospondin. *J. Neurosci. Res.* 38, 221–233.
- Chandrasekar, B., Mummidi, S., Perla, R.P., Bysani, S., Dulin, N.O., Liu, F., and Melby, P.C. (2003). Fractalkine (CX3CL1) stimulated by nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent inflammatory signals induces aortic smooth muscle cell proliferation through an autocrine pathway. *Biochem. J.* 373, 547–558.
- Chao, M.V. (2003). Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 299–309.
- Chen, Z., Jalabi, W., Hu, W., Park, H.-J., Gale, J.T., Kidd, G.J., Bernatowicz, R., Gossman, Z.C., Chen, J.T., Dutta, R., et al. (2014). Microglial displacement of inhibitory synapses provides neuroprotection in the adult brain. *Nat. Commun.* 5.
- Chicurel, M.E., and Harris, K.M. (1992). Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 325, 169–182.
- Choi, S.H., Veeraraghavalu, K., Lazarov, O., Marler, S., Ransohoff, R.M., Ramirez, J.M., and Sisodia, S.S. (2008). Non-Cell-Autonomous Effects of Presenilin 1 Variants on Enrichment-Mediated Hippocampal Progenitor Cell Proliferation and Differentiation. *Neuron* 59, 568–580.
- Clark, A.K., Gruber-Schoffnegger, D., Drdla-Schutting, R., Gerhold, K.J., Malcangio, M., and Sandkühler, J. (2015). Selective Activation of Microglia Facilitates Synaptic Strength. *J. Neurosci.* 35, 4552–4570.
- Cohen, A.S., Lin, D.D., and Coulter, D.A. (2000). Protracted postnatal development of inhibitory synaptic transmission in rat hippocampal area CA1 neurons. *J. Neurophysiol.* 84, 2465–2476.
- Corkin, S., Amaral, D.G., González, R.G., Johnson, K.A., and Hyman, B.T. (1997). H. M.'s Medial Temporal Lobe Lesion: Findings from Magnetic Resonance Imaging. *J. Neurosci.* 17, 3964–3979.
- Coull, J.A.M., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M.W., and De Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438, 1017–1021.
- Courchesne, E., Redcay, E., Morgan, J.T., and Kennedy, D.P. (2005). Autism at the beginning: microstructural and growth abnormalities underlying the cognitive and behavioral phenotype of autism. *Dev. Psychopathol.* 17, 577–597.
- Crépel, V., Aronov, D., Jorquera, I., Represa, A., Ben-Ari, Y., and Cossart, R. (2007). A Parturition-Associated Nonsynaptic Coherent Activity Pattern in the Developing Hippocampus. *Neuron* 54, 105–120.
- Cunningham, C.L., Martínez-Cerdeño, V., and Noctor, S.C. (2013). Microglia Regulate the Number of Neural Precursor Cells in the Developing Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* 33, 4216–4233.
- Dailey, M.E., and Waite, M. (1999). Confocal Imaging of Microglial Cell Dynamics in Hippocampal Slice Cultures. *Methods* 18, 222–230.

- Dalmau, I., Finsen, B., Tønder, N., Zimmer, J., González, B., and Castellano, B. (1997). Development of microglia in the prenatal rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* *377*, 70–84.
- Dalmau, I., Finsen, B., Zimmer, J., González, B., and Castellano, B. (1998). Development of microglia in the postnatal rat hippocampus. *Hippocampus* *8*, 458–474.
- Danglot, L., Triller, A., and Marty, S. (2006). The development of hippocampal interneurons in rodents. *Hippocampus* *16*, 1032–1060.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* *8*, 752–758.
- Davis, E.J., Foster, T.D., and Thomas, W.E. (1994). Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res. Bull.* *34*, 73–78.
- Delpech, J.-C., Wei, L., Hao, J., Yu, X., Madore, C., Butovsky, O., and Kaffman, A. (2016). Early life stress perturbs the maturation of microglia in the developing hippocampus. *Brain. Behav. Immun.* *57*, 79–93.
- Ding, S.L., Van Hoesen, G., and Rockland, K.S. (2000). Inferior parietal lobule projections to the presubiculum and neighboring ventromedial temporal cortical areas. *J. Comp. Neurol.* *425*, 510–530.
- Dissing-Olesen, L., LeDue, J.M., Rungta, R.L., Hefendehl, J.K., Choi, H.B., and MacVicar, B.A. (2014). Activation of Neuronal NMDA Receptors Triggers Transient ATP-Mediated Microglial Process Outgrowth. *J. Neurosci.* *34*, 10511–10527.
- Dupuy, S.T., and Houser, C.R. (1996). Prominent expression of two forms of glutamate decarboxylase in the embryonic and early postnatal rat hippocampal formation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *16*, 6919–6932.
- Dupuy, S.T., and Houser, C.R. (1997). Developmental changes in GABA neurons of the rat dentate gyrus: an in situ hybridization and birthdating study. *J. Comp. Neurol.* *389*, 402–418.
- Dzhala, V.I., Talos, D.M., Sdrulla, D.A., Brumback, A.C., Mathews, G.C., Benke, T.A., Delpire, E., Jensen, F.E., and Staley, K.J. (2005). NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat. Med.* *11*, 1205–1213.
- Eyo, U.B., Miner, S.A., Weiner, J.A., and Dailey, M.E. (2016). Developmental changes in microglial mobilization are independent of apoptosis in the neonatal mouse hippocampus. *Brain. Behav. Immun.* *55*, 49–59.
- Färber, K., and Kettenmann, H. (2005). Physiology of microglial cells. *Brain Res. Rev.* *48*, 133–143.
- Färber, K., and Kettenmann, H. (2006). Purinergic signaling and microglia. *Pflüg. Arch.* *452*, 615–621.
- Ferrer, I., Bernet, E., Soriano, E., Del Rio, T., and Fonseca, M. (1990). Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transitory phagocytes. *Neuroscience* *39*, 451–458.
- Ferrini, F., and De Koninck, Y. (2013). Microglia Control Neuronal Network Excitability via BDNF Signalling. *Neural Plast.* *2013*.
- Ferrini, F., Trang, T., Mattioli, T.-A.M., Laffray, S., Del’Guidice, T., Lorenzo, L.-E., Castonguay, A., Doyon, N., Zhang, W., Godin, A.G., et al. (2013). Morphine hyperalgesia gated through microglia-mediated disruption of neuronal Cl⁻ homeostasis. *Nat. Neurosci.* *16*, 183–192.

- Finch, D.M., Nowlin, N.L., and Babb, T.L. (1983). Demonstration of axonal projections of neurons in the rat hippocampus and subiculum by intracellular injection of HRP. *Brain Res.* 271, 201–216.
- Fontainhas, A.M., Wang, M., Liang, K.J., Chen, S., Mettu, P., Damani, M., Fariss, R.N., Li, W., and Wong, W.T. (2011). Microglial Morphology and Dynamic Behavior Is Regulated by Ionotropic Glutamatergic and GABAergic Neurotransmission. *PLOS ONE* 6, e15973.
- Frade, J.M., and Barde, Y.-A. (1998). Microglia-Derived Nerve Growth Factor Causes Cell Death in the Developing Retina. *Neuron* 20, 35–41.
- Frahm, C., and Draguhn, A. (2001). GAD and GABA transporter (GAT-1) mRNA expression in the developing rat hippocampus. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 132, 1–13.
- Freund, T.F., and Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6, 347–470.
- Fricker, M., Oliva-Martín, M.J., and Brown, G.C. (2012). Primary phagocytosis of viable neurons by microglia activated with LPS or A β is dependent on calreticulin/LRP phagocytic signalling. *J. Neuroinflammation* 9, 196.
- Fu, R., Shen, Q., Xu, P., Luo, J.J., and Tang, Y. (2014). Phagocytosis of Microglia in the Central Nervous System Diseases. *Mol. Neurobiol.* 49, 1422.
- Fuentealba, P., Begum, R., Capogna, M., Jinno, S., Márton, L.F., Csicsvari, J., Thomson, A., Somogyi, P., and Klausberger, T. (2008). Ivy cells: a population of nitric-oxide-producing, slow-spiking GABAergic neurons and their involvement in hippocampal network activity. *Neuron* 57, 917–929.
- Fukuda, T., and Kosaka, T. (2000). Gap junctions linking the dendritic network of GABAergic interneurons in the hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 1519–1528.
- Gaiarsa, J.L., Beaudoin, M., and Ben-Ari, Y. (1992). Effect of neonatal degranulation on the morphological development of rat CA3 pyramidal neurons: inductive role of mossy fibers on the formation of thorny excrescences. *J. Comp. Neurol.* 321, 612–625.
- Gebara, E.G., Sultan, S., Kocher-Braissant, J., and Toni, N. (2013). Adult hippocampal neurogenesis inversely correlates with microglia in conditions of voluntary running and aging. *Neurogenesis* 7, 145.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* 330, 841–845.
- Giovanoli, S., Engler, H., Engler, A., Richetto, J., Voget, M., Willi, R., Winter, C., Riva, M.A., Mortensen, P.B., Feldon, J., et al. (2013). Stress in puberty unmasks latent neuropathological consequences of prenatal immune activation in mice. *Science* 339, 1095–1099.
- Gloor, P., Salanova, V., Olivier, A., and Quesney, L.F. (1993). The human dorsal hippocampal commissure. An anatomically identifiable and functional pathway. *Brain J. Neurol.* 116 (Pt 5), 1249–1273.
- Goldstein, P.A., Elsen, F.P., Ying, S.-W., Ferguson, C., Homanics, G.E., and Harrison, N.L. (2002). Prolongation of hippocampal miniature inhibitory postsynaptic currents in mice lacking the GABA(A) receptor alpha1 subunit. *J. Neurophysiol.* 88, 3208–3217.
- Gomez-Di Cesare, C.M., Smith, K.L., Rice, F.L., and Swann, J.W. (1997). Axonal remodeling during postnatal maturation of CA3 hippocampal pyramidal neurons. *J. Comp. Neurol.* 384, 165–180.

- Gomez-Nicola, D., and Perry, V.H. (2015). Microglial Dynamics and Role in the Healthy and Diseased Brain A Paradigm of Functional Plasticity. *The Neuroscientist* 21, 169–184.
- Gonzales, R.B., DeLeon Galvan, C.J., Rangel, Y.M., and Claiborne, B.J. (2001). Distribution of thorny excrescences on CA3 pyramidal neurons in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 430, 357–368.
- Gould, E. (1994). The Effects of Adrenal Steroids and Excitatory Input on Neuronal Birth and Survival. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 743, 73–92.
- Graber, D.J., Hickey, W.F., and Harris, B.T. (2010). Progressive changes in microglia and macrophages in spinal cord and peripheral nerve in the transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroinflammation* 7, 8.
- Grinberg, Y.Y., Milton, J.G., and Kraig, R.P. (2011). Spreading Depression Sends Microglia on Lévy Flights. *PLOS ONE* 6, e19294.
- Groenewegen, H.J., Room, P., Witter, M.P., and Lohman, A.H. (1982). Cortical afferents of the nucleus accumbens in the cat, studied with anterograde and retrograde transport techniques. *Neuroscience* 7, 977–996.
- Gulyás, A.I., and Freund, T.F. (1996). Pyramidal cell dendrites are the primary targets of calbindin D28k-immunoreactive interneurons in the hippocampus. *Hippocampus* 6, 525–534.
- Gulyás, A.I., Hájos, N., and Freund, T.F. (1996). Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 3397–3411.
- Hajos, N., Acsady, L., and Freund, T.F. (1996). Target selectivity and neurochemical characteristics of VIP-immunoreactive interneurons in the rat dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.* 8, 1415–1431.
- Hamerman, J.A., Jarjoura, J.R., Humphrey, M.B., Nakamura, M.C., Seaman, W.E., and Lanier, L.L. (2006). Cutting Edge: Inhibition of TLR and FcR Responses in Macrophages by Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells (TREM)-2 and DAP12. *J. Immunol.* 177, 2051–2055.
- Hammer, M., Krueger-Burg, D., Tuffy, L.P., Cooper, B.H., Taschenberger, H., Goswami, S.P., Ehrenreich, H., Jonas, P., Varoqueaux, F., Rhee, J.-S., et al. (2015). Perturbed Hippocampal Synaptic Inhibition and γ -Oscillations in a Neuroligin-4 Knockout Mouse Model of Autism. *Cell Rep.* 13, 516–523.
- Hanisch, U.-K. (2013). Proteins in microglial activation—inputs and outputs by subsets. *Curr. Protein Pept. Sci.* 14, 3–15.
- Hanisch, U.-K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10, 1387–1394.
- Harrison, J.K., Jiang, Y., Chen, S., Xia, Y., Maciejewski, D., McNamara, R.K., Streit, W.J., Salafranca, M.N., Adhikari, S., Thompson, D.A., et al. (1998). Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 10896–10901.
- Hatori, K., Nagai, A., Heisel, R., Ryu, J.K., and Kim, S.U. (2002). Fractalkine and fractalkine receptors in human neurons and glial cells. *J. Neurosci. Res.* 69, 418–426.
- Heckers, S., Heinsen, H., Heinsen, Y.C., and Beckmann, H. (1990). Limbic structures and lateral ventricle in schizophrenia. A quantitative postmortem study. *Arch. Gen. Psychiatry* 47, 1016–1022.

- Heinisch, S., and Kirby, L.G. (2009). Fractalkine/CX3CL1 enhances GABA synaptic activity at serotonin neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* 164, 1210–1223.
- Herbomel, P., Thisse, B., and Thisse, C. (1999). Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development* 126, 3735–3745.
- Herbomel, P., Thisse, B., and Thisse, C. (2001). Zebrafish Early Macrophages Colonize Cephalic Mesenchyme and Developing Brain, Retina, and Epidermis through a M-CSF Receptor-Dependent Invasive Process. *Dev. Biol.* 238, 274–288.
- Hölscher, C. (2003). Time, space and hippocampal functions. *Rev. Neurosci.* 14, 253–284.
- Hoshiko, M., Arnoux, I., Avignone, E., Yamamoto, N., and Audinat, E. (2012). Deficiency of the Microglial Receptor CX3CR1 Impairs Postnatal Functional Development of Thalamocortical Synapses in the Barrel Cortex. *J. Neurosci.* 32, 15106–15111.
- Hosokawa, Y., Sciancalepore, M., Stratta, F., Martina, M., and Cherubini, E. (1994). Developmental changes in spontaneous GABAA-mediated synaptic events in rat hippocampal CA3 neurons. *Eur. J. Neurosci.* 6, 805–813.
- Hsia, A.Y., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1998). Development of Excitatory Circuitry in the Hippocampus. *J. Neurophysiol.* 79, 2013–2024.
- Hua, J.Y., and Smith, S.J. (2004). Neural activity and the dynamics of central nervous system development. *Nat. Neurosci.* 7, 327–332.
- Imai, T., Hieshima, K., Haskell, C., Baba, M., Nagira, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Nomiya, H., Schall, T.J., et al. (1997). Identification and Molecular Characterization of Fractalkine Receptor CX3CR1, which Mediates Both Leukocyte Migration and Adhesion. *Cell* 91, 521–530.
- Inokuchi, K. (2011). Adult neurogenesis and modulation of neural circuit function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 360–364.
- Insausti, R., and Muñoz, M. (2001). Cortical projections of the non-entorhinal hippocampal formation in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Eur. J. Neurosci.* 14, 435–451.
- Insausti, R., Amaral, D.G., and Cowan, W.M. (1987a). The entorhinal cortex of the monkey: II. Cortical afferents. *J. Comp. Neurol.* 264, 356–395.
- Insausti, R., Amaral, D.G., and Cowan, W.M. (1987b). The entorhinal cortex of the monkey: III. Subcortical afferents. *J. Comp. Neurol.* 264, 396–408.
- Ishizuka, N., Weber, J., and Amaral, D.G. (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J. Comp. Neurol.* 295, 580–623.
- Ishizuka, N., Cowan, W.M., and Amaral, D.G. (1995). A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 362, 17–45.
- Jinno, S., Klausberger, T., Marton, L.F., Dalezios, Y., Roberts, J.D.B., Fuentealba, P., Bushong, E.A., Henze, D., Buzsáki, G., and Somogyi, P. (2007a). Neuronal Diversity in GABAergic Long-Range Projections from the Hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 8790.

- Jinno, S., Fleischer, F., Eckel, S., Schmidt, V., and Kosaka, T. (2007b). Spatial arrangement of microglia in the mouse hippocampus: A stereological study in comparison with astrocytes. *Glia* 55, 1334–1347.
- Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A., and Littman, D.R. (2000). Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4106–4114.
- Kaindl, A.M., Degos, V., Peineau, S., Gouadon, E., Chhor, V., Loron, G., Le Charpentier, T., Josserand, J., Ali, C., Vivien, D., et al. (2012). Activation of microglial N-methyl-D-aspartate receptors triggers inflammation and neuronal cell death in the developing and mature brain. *Ann. Neurol.* 72, 536–549.
- Kalla, R., Liu, Z., Xu, S., Koppius, A., Imai, Y., Kloss, C.U., Kohsaka, S., Gschwendtner, A., Möller, J.C., Werner, A., et al. (2001). Microglia and the early phase of immune surveillance in the axotomized facial motor nucleus: impaired microglial activation and lymphocyte recruitment but no effect on neuronal survival or axonal regeneration in macrophage-colony stimulating factor-deficient mice. *J. Comp. Neurol.* 436, 182–201.
- Kasyanov, A.M., Safiulina, V.F., Voronin, L.L., and Cherubini, E. (2004). From the Cover: GABA-mediated giant depolarizing potentials as coincidence detectors for enhancing synaptic efficacy in the developing hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3967.
- Katona, I., Sperl gh, B., S k, A., K falvi, A., Vizi, E.S., Mackie, K., and Freund, T.F. (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 4544–4558.
- Katz, L.C., and Shatz, C.J. (1996). Synaptic Activity and the Construction of Cortical Circuits. *Science* 274, 1133–1138.
- Kaushal, V., and Schlichter, L.C. (2008). Mechanisms of Microglia-Mediated Neurotoxicity in a New Model of the Stroke Penumbra. *J. Neurosci.* 28, 2221–2230.
- Kettenmann, H., Hoppe, D., Gottmann, K., Banati, R., and Kreutzberg, G. (1990). Cultured microglial cells have a distinct pattern of membrane channels different from peritoneal macrophages. *J. Neurosci. Res.* 26, 278–287.
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., and Verkhratsky, A. (2011). Physiology of Microglia. *Physiol. Rev.* 91, 461–553.
- Khalilov, I., Minlebaev, M., Mukhtarov, M., and Khazipov, R. (2015). Dynamic Changes from Depolarizing to Hyperpolarizing GABAergic Actions during Giant Depolarizing Potentials in the Neonatal Rat Hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 12635–12642.
- Khazipov, R., Congar, P., and Ben-Ari, Y. (1995). Hippocampal CA1 lacunosum-moleculare interneurons: modulation of monosynaptic GABAergic IPSCs by presynaptic GABAB receptors. *J. Neurophysiol.* 74, 2126–2137.
- Khazipov, R., Esclapez, M., Caillard, O., Bernard, C., Khalilov, I., Tyzio, R., Hirsch, J., Dzhalala, V., Berger, B., and Ben-Ari, Y. (2001). Early development of neuronal activity in the primate hippocampus in utero. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 9770–9781.
- Kierdorf, K., Erny, D., Goldmann, T., Sander, V., Schulz, C., Perdiguero, E.G., Wieghofer, P., Heinrich, A., Riemke, P., H lscher, C., et al. (2013). Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat. Neurosci.* 16, 273–280.

- Kim, H.-J., Cho, M.-H., Shim, W.H., Kim, J.K., Jeon, E.-Y., Kim, D.-H., and Yoon, S.-Y. (2016). Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects. *Mol. Psychiatry*.
- Koenigsknecht-Talboo, J., and Landreth, G.E. (2005). Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 8240–8249.
- Köhler, C., and Steinbusch, H. (1982). Identification of serotonin and non-serotonin-containing neurons of the mid-brain raphe projecting to the entorhinal area and the hippocampal formation. A combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat brain. *Neuroscience* *7*, 951–975.
- Köhler, C., Chan-Palay, V., and Wu, J.Y. (1984). Septal neurons containing glutamic acid decarboxylase immunoreactivity project to the hippocampal region in the rat brain. *Anat. Embryol. (Berl.)* *169*, 41–44.
- Kongsui, R., Beynon, S.B., Johnson, S.J., and Walker, F.R. (2014). Quantitative assessment of microglial morphology and density reveals remarkable consistency in the distribution and morphology of cells within the healthy prefrontal cortex of the rat. *J. Neuroinflammation* *11*, 1.
- Kosaka, T., Katsumaru, H., Hama, K., Wu, J.Y., and Heizmann, C.W. (1987). GABAergic neurons containing the Ca²⁺-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain Res.* *419*, 119–130.
- Kozłowski, C., and Weimer, R.M. (2012). An automated method to quantify microglia morphology and application to monitor activation state longitudinally in vivo. *PLoS One* *7*, e31814.
- Krettek, J.E., and Price, J.L. (1977). Projections from the amygdaloid complex and adjacent olfactory structures to the entorhinal cortex and to the subiculum in the rat and cat. *J. Comp. Neurol.* *172*, 723–752.
- Kreutzberg, G.W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* *19*, 312–318.
- Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annu. Rev. Neurosci.* *32*, 149–184.
- Lai, A.Y., Swayze, R.D., El-Husseini, A., and Song, C. (2006). Interleukin-1 beta modulates AMPA receptor expression and phosphorylation in hippocampal neurons. *J. Neuroimmunol.* *175*, 97–106.
- Laurie, D.J., Wisden, W., and Seeburg, P.H. (1992). The distribution of thirteen GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *12*, 4151–4172.
- Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P., and Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* *39*, 151–170.
- Lee, I., Yoganarasimha, D., Rao, G., and Knierim, J.J. (2004). Comparison of population coherence of place cells in hippocampal subfields CA1 and CA3. *Nature* *430*, 456–459.
- Lee, S., Varvel, N.H., Konerth, M.E., Xu, G., Cardona, A.E., Ransohoff, R.M., and Lamb, B.T. (2010). CX3CR1 Deficiency Alters Microglial Activation and Reduces Beta-Amyloid Deposition in Two Alzheimer's Disease Mouse Models. *Am. J. Pathol.* *177*, 2549.
- Leinekugel, X., Khazipov, R., Cannon, R., Hirase, H., Ben-Ari, Y., and Buzsáki, G. (2002). Correlated bursts of activity in the neonatal hippocampus in vivo. *Science* *296*, 2049–2052.

- Lenz, K.M., Nugent, B.M., Haliyur, R., and McCarthy, M.M. (2013). Microglia are essential to masculinization of brain and behavior. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 2761–2772.
- Leutgeb, S., Leutgeb, J.K., Treves, A., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2004). Distinct ensemble codes in hippocampal areas CA3 and CA1. *Science* *305*, 1295–1298.
- Li, H., Tornberg, J., Kaila, K., Airaksinen, M.S., and Rivera, C. (2002). Patterns of cation-chloride cotransporter expression during embryonic rodent CNS development. *Eur. J. Neurosci.* *16*, 2358–2370.
- Li, Y., Du, X., Liu, C., Wen, Z., and Du, J. (2012). Reciprocal Regulation between Resting Microglial Dynamics and Neuronal Activity In Vivo. *Dev. Cell* *23*, 1189–1202.
- Liang, K.J., Lee, J.E., Wang, Y.D., Ma, W., Fontainhas, A.M., Fariss, R.N., and Wong, W.T. (2009). Regulation of Dynamic Behavior of Retinal Microglia by CX3CR1 Signaling. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *50*, 4444–4451.
- Linnartz, B., Kopatz, J., Tenner, A.J., and Neumann, H. (2012). Sialic Acid on the Neuronal Glycocalyx Prevents Complement C1 Binding and Complement Receptor-3-Mediated Removal by Microglia. *J. Neurosci.* *32*, 946–952.
- Liu, Z., Chen, H.-Q., Huang, Y., Qiu, Y.-H., and Peng, Y.-P. (2016). Transforming growth factor- β 1 acts via T β R-1 on microglia to protect against MPP⁺-induced dopaminergic neuronal loss. *Brain. Behav. Immun.* *51*, 131–143.
- Lodge, D.J. (2013). The MAM rodent model of schizophrenia. *Curr. Protoc. Neurosci.* Editor. Board Jacqueline N Crawley *AI 09*, Unit9.43.
- Lodge, D.J., and Grace, A.A. (2009). Gestational methylazoxymethanol acetate administration: A developmental disruption model of schizophrenia. *Behav. Brain Res.* *204*, 306–312.
- Longson, D., Deakin, J.F., and Benes, F.M. (1996). Increased density of entorhinal glutamate-immunoreactive vertical fibers in schizophrenia. *J. Neural Transm. Vienna Austria* *103*, 503–507.
- Lyons, S.A., Pastor, A., Ohlemeyer, C., Kann, O., Wiegand, F., Prass, K., Knapp, F., Kettenmann, H., and Dirnagl, U. (2000). Distinct Physiologic Properties of Microglia and Blood-Borne Cells in Rat Brain Slices After Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *20*, 1537–1549.
- Maccaferri, G., David, J., Roberts, B., Szucs, P., Cottingham, C.A., and Somogyi, P. (2000). Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified GABAergic neurones in rat hippocampus in vitro. *J. Physiol.* *524*, 91–116.
- Machado, C.J., Whitaker, A.M., Smith, S.E.P., Patterson, P.H., and Bauman, M.D. (2015). Maternal Immune Activation in Nonhuman Primates Alters Social Attention in Juvenile Offspring. *Biol. Psychiatry* *77*, 823–832.
- Maciejewski-Lenoir, D., Chen, S., Feng, L., Maki, R., and Bacon, K.B. (1999). Characterization of Fractalkine in Rat Brain Cells: Migratory and Activation Signals for CX3CR-1-Expressing Microglia. *J. Immunol.* *163*, 1628–1635.
- Malkova, N.V., Yu, C.Z., Hsiao, E.Y., Moore, M.J., and Patterson, P.H. (2012). Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. *Brain. Behav. Immun.* *26*, 607–616.
- Mallat, M., Marín-Teva, J.L., and Chéret, C. (2005). Phagocytosis in the developing CNS: more than clearing the corpses. *Curr. Opin. Neurobiol.* *15*, 101–107.

- Mandolesi, G., Musella, A., Gentile, A., Grasselli, G., Haji, N., Sepman, H., Fresegna, D., Bullitta, S., De Vito, F., Musumeci, G., et al. (2013). Interleukin-1 β alters glutamate transmission at purkinje cell synapses in a mouse model of multiple sclerosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 12105–12121.
- Marín-Teva, J.L., Cuadros, M.A., Calvente, R., Almendros, A., and Navascués, J. (1999). Naturally occurring cell death and migration of microglial precursors in the quail retina during normal development. *J. Comp. Neurol.* *412*, 255–275.
- Marín-Teva, J.L., Dusart, I., Colin, C., Gervais, A., van Rooijen, N., and Mallat, M. (2004). Microglia Promote the Death of Developing Purkinje Cells. *Neuron* *41*, 535–547.
- Marty, S., Wehrlé, R., Alvarez-Leefmans, F.J., Gasnier, B., and Sotelo, C. (2002). Postnatal maturation of Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter expression and inhibitory synaptogenesis in the rat hippocampus: an immunocytochemical analysis. *Eur. J. Neurosci.* *15*, 233–245.
- Matcovitch-Natan, O., Winter, D.R., Giladi, A., Aguilar, S.V., Spinrad, A., Sarrazin, S., Ben-Yehuda, H., David, E., González, F.Z., Perrin, P., et al. (2016). Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science* aad8670.
- Mazaheri, F., Breus, O., Durdu, S., Haas, P., Wittbrodt, J., Gilmour, D., and Peri, F. (2014). Distinct roles for BAI1 and TIM-4 in the engulfment of dying neurons by microglia. *Nat. Commun.* *5*.
- McCoy, M.K., and Tansey, M.G. (2008). TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J. Neuroinflammation* *5*, 45.
- Melamed, O., Levav-Rabkin, T., Zukerman, C., Clarke, G., Cryan, J.F., Dinan, T.G., Grossman, Y., and Golan, H.M. (2014). Long-lasting glutamatergic modulation induced by neonatal GABA enhancement in mice. *Neuropharmacology* *79*, 616–625.
- Menendez de la Prida, L., Bolea, S., and Sanchez-Andres, J.V. (1998). Origin of the synchronized network activity in the rabbit developing hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* *10*, 899–906.
- Menteyne, A., Levavasseur, F., Audinat, E., and Avignone, E. (2009). Predominant Functional Expression of Kv1.3 by Activated Microglia of the Hippocampus after Status epilepticus. *PLoS ONE* *4*.
- Mesulam, M.M., Mufson, E.J., Levey, A.I., and Wainer, B.H. (1983). Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* *214*, 170–197.
- Meucci, O., Fatatis, A., Simen, A.A., Bushell, T.J., Gray, P.W., and Miller, R.J. (1998). Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and gp120 neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 14500–14505.
- Milligan, C.E., Cunningham, T.J., and Levitt, P. (1991). Differential immunochemical markers reveal the normal distribution of brain macrophages and microglia in the developing rat brain. *J. Comp. Neurol.* *314*, 125–135.
- Milner, B. (2003). Visual recognition and recall after right temporal-lobe excision in man. *Epilepsy Behav.* *4*, 799–812.
- Mione, M.C., Danevic, C., Boardman, P., Harris, B., and Parnavelas, J.G. (1994). Lineage analysis reveals neurotransmitter (GABA or glutamate) but not calcium-binding protein homogeneity in clonally related cortical neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *14*, 107–123.

- Mittelbronn, M., Dietz, K., Schluesener, H.J., and Meyermann, R. (2001). Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *101*, 249–255.
- Miyamoto, A., Wake, H., Ishikawa, A.W., Eto, K., Shibata, K., Murakoshi, H., Koizumi, S., Moorhouse, A.J., Yoshimura, Y., and Nabekura, J. (2016). Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nat. Commun.* *7*.
- Mizutani, M., Pino, P.A., Saederup, N., Charo, I.F., Ransohoff, R.M., and Cardona, A.E. (2012). The Fractalkine Receptor but Not CCR2 Is Present on Microglia from Embryonic Development throughout Adulthood. *J. Immunol.* *188*, 29–36.
- Mohajerani, M.H., and Cherubini, E. (2005). Spontaneous recurrent network activity in organotypic rat hippocampal slices. *Eur. J. Neurosci.* *22*, 107–118.
- Mohajerani, M.H., and Cherubini, E. (2006). Role of giant depolarizing potentials in shaping synaptic currents in the developing hippocampus. *Crit. Rev. Neurobiol.* *18*, 13–23.
- Mohajerani, M.H., Sivakumaran, S., Zacchi, P., Aguilera, P., and Cherubini, E. (2007). Correlated network activity enhances synaptic efficacy via BDNF and the ERK pathway at immature CA3–CA1 connections in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 13176.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., and Seeburg, P.H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* *12*, 529–540.
- Moran, L.B., and Graeber, M.B. (2004). The facial nerve axotomy model. *Brain Res. Rev.* *44*, 154–178.
- Morganti, J.M., Nash, K.R., Grimmig, B.A., Ranjit, S., Small, B., Bickford, P.C., and Gemma, C. (2012). The soluble isoform of CX3CL1 is necessary for neuroprotection in a mouse model of Parkinson’s disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 14592.
- Morozov, Y.M., and Freund, T.F. (2003). Postnatal development and migration of cholecystokinin-immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience* *120*, 923–939.
- Morozov, Y.M., Ayoub, A.E., and Rakic, P. (2006). Translocation of synaptically connected interneurons across the dentate gyrus of the early postnatal rat hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 5017–5027.
- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., and O’Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* *297*, 681–683.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 958–969.
- Müller, N., Weidinger, E., Leitner, B., and Schwarz, M.J. (2015). The role of inflammation in schizophrenia. *Neuropharmacology* *372*.
- Nadarajah, B., and Parnavelas, J.G. (2002). Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* *3*, 423–432.
- Nagata, K., Takei, N., Nakajima, K., Saito, H., and Kohsaka, S. (1993). Microglial conditioned medium promotes survival and development of cultured mesencephalic neurons from embryonic rat brain. *J. Neurosci. Res.* *34*, 357–363.

- Napoli, I., and Neumann, H. (2009). Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience* 158, 1030–1038.
- Navascués, J., Calvente, R., Marín-Teva, J.L., and Cuadros, M.A. (2000). Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 72, 91–102.
- Nayak, D., Zinselmeyer, B.H., Corps, K.N., and McGavern, D.B. (2012). In vivo dynamics of innate immune sentinels in the CNS. *IntraVital* 1, 95–106.
- Neher, J.J., Neniskyte, U., Zhao, J.-W., Bal-Price, A., Tolkovsky, A.M., and Brown, G.C. (2011). Inhibition of Microglial Phagocytosis Is Sufficient To Prevent Inflammatory Neuronal Death. *J. Immunol.* 186, 4973–4983.
- Neher, J.J., Emmrich, J.V., Fricker, M., Mander, P.K., Théry, C., and Brown, G.C. (2013). Phagocytosis executes delayed neuronal death after focal brain ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E4098–E4107.
- Neher, J.J., Neniskyte, U., Hornik, T., and Brown, G.C. (2014). Inhibition of UDP/P2Y6 purinergic signaling prevents phagocytosis of viable neurons by activated microglia in vitro and in vivo. *Glia* n/a-n/a.
- Nery, S., Fishell, G., and Corbin, J.G. (2002). The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nat. Neurosci.* 5, 1279–1287.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science* 308, 1314–1318.
- Oh, W.C., Lutz, S., Castillo, P.E., and Kwon, H.-B. (2016). De novo synaptogenesis induced by GABA in the developing mouse cortex. *Science* 353, 1037–1040.
- O’Keefe, J., and Conway, D.H. (1978). Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire. *Exp. Brain Res.* 31, 573–590.
- O’Keefe, J., and Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 34, 171–175.
- Olson, J.K., and Miller, S.D. (2004). Microglia Initiate Central Nervous System Innate and Adaptive Immune Responses through Multiple TLRs. *J. Immunol.* 173, 3916–3924.
- Olton, D.S., Branch, M., and Best, P.J. (1978). Spatial correlates of hippocampal unit activity. *Exp. Neurol.* 58, 387–409.
- Otnaess, M.K., Brun, V.H., Moser, M.B., and Moser, E.I. (1999). Pretraining prevents spatial learning impairment after saturation of hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, RC49.
- Pagani, F., Paolicelli, R.C., Murana, E., Cortese, B., Angelantonio, S.D., Zurolo, E., Guiducci, E., Ferreira, T.A., Garofalo, S., Catalano, M., et al. (2015). Defective microglial development in the hippocampus of Cx3cr1 deficient mice. *Front. Cell. Neurosci.* 111.
- Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., et al. (2011). Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science* 333, 1456–1458.
- Papez, J.W. (1995). A proposed mechanism of emotion. 1937. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 7, 103–112.

- Parkhurst, C.N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J.N., Yates III, J.R., Lafaille, J.J., Hempstead, B.L., Littman, D.R., and Gan, W.-B. (2013). Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell* *155*, 1596–1609.
- Parnavelas, J.G., Barfield, J.A., Franke, E., and Luskin, M.B. (1991). Separate progenitor cells give rise to pyramidal and nonpyramidal neurons in the rat telencephalon. *Cereb. Cortex N. Y. N* *1991* *1*, 463–468.
- Pascual, O., Achour, S.B., Rostaing, P., Triller, A., and Bessis, A. (2012). Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E197.
- Pearce, R.A. (1993). Physiological evidence for two distinct GABAA responses in rat hippocampus. *Neuron* *10*, 189–200.
- Pearce, R.A., Grunder, S.D., and Faucher, L.D. (1995). Different mechanisms for use-dependent depression of two GABAA-mediated IPSCs in rat hippocampus. *J. Physiol.* *484*, 425.
- Perez-Pouchoulen, M., VanRyzin, J.W., and McCarthy, M.M. (2015). Morphological and Phagocytic Profile of Microglia in the Developing Rat Cerebellum,,. *eNeuro* *2*.
- Petralia, R.S., and Wenthold, R.J. (1992). Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* *318*, 329–354.
- Picardo, M.A., Guigue, P., Bonifazi, P., Batista-Brito, R., Allene, C., Ribas, A., Fishell, G., Baude, A., and Cossart, R. (2011). Pioneer GABA cells comprise a subpopulation of hub neurons in the developing hippocampus. *Neuron* *71*, 695.
- Pirker, S., Schwarzer, C., Wieselthaler, A., Sieghart, W., and Sperk, G. (2000). GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* *101*, 815–850.
- Pizzarelli, R., and Cherubini, E. (2013). Developmental regulation of GABAergic signalling in the hippocampus of neurologically 3 R451C knock-in mice: an animal model of Autism. *Front. Cell. Neurosci.* *7*.
- Pocock, J.M., and Kettenmann, H. (2007). Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci.* *30*, 527–535.
- Pont-Lezica, L., Béchade, C., Belarif-Cantaut, Y., Pascual, O., and Bessis, A. (2011). Physiological roles of microglia during development. *J. Neurochem.* *119*, 901–908.
- Pont-Lezica, L., Beumer, W., Colasse, S., Drexhage, H., Versnel, M., and Bessis, A. (2014). Microglia shape corpus callosum axon tract fasciculation: functional impact of prenatal inflammation. *Eur. J. Neurosci.* *39*, 1551–1557.
- Ranck, J.B. (1973). Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats. I. Behavioral correlates and firing repertoires. *Exp. Neurol.* *41*, 461–531.
- Redondo-Castro, E., Hernández, J., Mahy, N., and Navarro, X. (2013). Phagocytic microglial phenotype induced by glibenclamide improves functional recovery but worsens hyperalgesia after spinal cord injury in adult rats. *Eur. J. Neurosci.* *38*, 3786–3798.
- Reynolds, G.P., Czudek, C., and Andrews, H.B. (1990). Deficit and hemispheric asymmetry of GABA uptake sites in the hippocampus in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* *27*, 1038–1044.

- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J.A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., and Kaila, K. (1999). The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* *397*, 251–255.
- Rogers, J.T., Morganti, J.M., Bachstetter, A.D., Hudson, C.E., Peters, M.M., Grimmig, B.A., Weeber, E.J., Bickford, P.C., and Gemma, C. (2011). CX3CR1 Deficiency Leads to Impairment of Hippocampal Cognitive Function and Synaptic Plasticity. *J. Neurosci.* *31*, 16241–16250.
- Romo-Parra, H., Treviño, M., Heinemann, U., and Gutiérrez, R. (2008). GABA actions in hippocampal area CA3 during postnatal development: differential shift from depolarizing to hyperpolarizing in somatic and dendritic compartments. *J. Neurophysiol.* *99*, 1523–1534.
- Rosene, D.L., and Van Hoesen, G.W. (1977). Hippocampal efferents reach widespread areas of cerebral cortex and amygdala in the rhesus monkey. *Science* *198*, 315–317.
- Roumier, A., Béchade, C., Poncer, J.-C., Smalla, K.-H., Tomasello, E., Vivier, E., Gundelfinger, E.D., Triller, A., and Bessis, A. (2004). Impaired Synaptic Function in the Microglial KARAP/DAP12-Deficient Mouse. *J. Neurosci.* *24*, 11421–11428.
- Routh, B.N., Johnston, D., Harris, K., and Chitwood, R.A. (2009). Anatomical and Electrophysiological Comparison of CA1 Pyramidal Neurons of the Rat and Mouse. *J. Neurophysiol.* *102*, 2288.
- Rubenstein, J.L.R., and Merzenich, M.M. (2003). Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav.* *2*, 255–267.
- Safiulina, V.F., Kasyanov, A.M., Sokolova, E., Cherubini, E., and Giniatullin, R. (2005). ATP contributes to the generation of network-driven giant depolarizing potentials in the neonatal rat hippocampus. *J. Physiol.* *565*, 981–992.
- Saucier, D., and Cain, D.P. (1995). Spatial learning without NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Nature* *378*, 186–189.
- Savchenko, V.L., McKanna, J.A., Nikonenko, I.R., and Skibo, G.G. (2000). Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. *Neuroscience* *96*, 195–203.
- Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Barres, B.A., and Stevens, B. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron* *74*, 691–705.
- Schafer, D.P., Lehrman, E.K., and Stevens, B. (2013). The “Quad-partite” Synapse: Microglia-Synapse Interactions in the Developing and Mature CNS. *Glia* *61*, 24–36.
- Schall, T. (1997). Fractalkine — a strange attractor in the chemokine landscape. *Immunol. Today* *18*, 147.
- Schilling, T., and Eder, C. (2007). Ion channel expression in resting and activated microglia of hippocampal slices from juvenile mice. *Brain Res.* *1186*, 21–28.
- Schlegelmilch, T., Henke, K., and Peri, F. (2011). Microglia in the developing brain: from immunity to behaviour. *Curr. Opin. Neurobiol.* *21*, 5–10.
- Schultz, C., and Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the hippocampal formation. *Front. Neurol. Neurosci.* *34*, 6–17.

- Schulz, C., Perdiguero, E.G., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E.W., Pollard, J.W., et al. (2012). A Lineage of Myeloid Cells Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells. *Science* 336, 86–90.
- Schwartz, M., Butovsky, O., Brück, W., and Hanisch, U.-K. (2006). Microglial phenotype: is the commitment reversible? *Trends Neurosci.* 29, 68–74.
- Schwarz, J.M., Sholar, P.W., and Bilbo, S.D. (2012). Sex differences in microglial colonization of the developing rat brain. *J. Neurochem.* 120, 948–963.
- Scoville, W.B., and Milner, B. (1957). LOSS OF RECENT MEMORY AFTER BILATERAL HIPPOCAMPAL LESIONS. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 20, 11.
- Sedel, F., Béchade, C., Vyas, S., and Triller, A. (2004). Macrophage-Derived Tumor Necrosis Factor α , an Early Developmental Signal for Motoneuron Death. *J. Neurosci.* 24, 2236–2246.
- Segal, M., and Landis, S. (1974). Afferents to the hippocampus of the rat studied with the method of retrograde transport of horseradish peroxidase. *Brain Res.* 78, 1–15.
- Seress, L., and Ribak, C.E. (1990). The synaptic connections of basket cell axons in the developing rat hippocampal formation. *Exp. Brain Res.* 81, 500–508.
- Seress, L., Abrahám, H., Hajnal, A., Lin, H., and Totterdell, S. (2005). NOS-positive local circuit neurons are exclusively axo-dendritic cells both in the neo- and archi-cortex of the rat brain. *Brain Res.* 1056, 183–190.
- Shao, L.-R., and Dudek, F.E. (2009). Both synaptic and intrinsic mechanisms underlie the different properties of population bursts in the hippocampal CA3 area of immature versus adult rats. *J. Physiol.* 587, 5907.
- Sharaf, A., Krieglstein, K., and Spittau, B. (2012). Distribution of microglia in the postnatal murine nigrostriatal system. *Cell Tissue Res.* 351, 373–382.
- Sheng, J.G., Mrak, R.E., and Griffin, W.S. (1997). Neuritic plaque evolution in Alzheimer's disease is accompanied by transition of activated microglia from primed to enlarged to phagocytic forms. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 94, 1–5.
- Sheridan, G.K., and Murphy, K.J. (2013). Neuron–glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3CR1 take centre stage. *Open Biol.* 3, 130181.
- Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Goldman, J.E., Sekino, Y., and Sato, K. (2014). Microglia Enhance Neurogenesis and Oligodendrogenesis in the Early Postnatal Subventricular Zone. *J. Neurosci.* 34, 2231–2243.
- Siegel, A., Ohgami, S., and Edinger, H. (1975). Projections of the hippocampus to the septal area in the squirrel monkey. *Brain Res.* 99, 247–260.
- Sierra, A., Encinas, J.M., Deudero, J.J.P., Chancey, J.H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L.S., Tsirka, S.E., and Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia Shape Adult Hippocampal Neurogenesis through Apoptosis-Coupled Phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7, 483–495.
- Sierra, A., Abiega, O., Shahraz, A., and Neumann, H. (2013). Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 6.

- Sierra, A., Tremblay, M.-È., and Wake, H. (2014). Never-resting microglia: physiological roles in the healthy brain and pathological implications. *Front. Cell. Neurosci.* *8*.
- Simpson, M.D., Slater, P., Deakin, J.F., Royston, M.C., and Skan, W.J. (1989). Reduced GABA uptake sites in the temporal lobe in schizophrenia. *Neurosci. Lett.* *107*, 211–215.
- Simpson, M.D., Slater, P., and Deakin, J.F. (1998). Comparison of glutamate and gamma-aminobutyric acid uptake binding sites in frontal and temporal lobes in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* *44*, 423–427.
- Soltys, Z., Ziąja, M., Pawliński, R., Setkowicz, Z., and Janeczko, K. (2001). Morphology of reactive microglia in the injured cerebral cortex. Fractal analysis and complementary quantitative methods. *J. Neurosci. Res.* *63*, 90–97.
- Somogyi, P., Nunzi, M.G., Gorio, A., and Smith, A.D. (1983). A new type of specific interneuron in the monkey hippocampus forming synapses exclusively with the axon initial segments of pyramidal cells. *Brain Res.* *259*, 137–142.
- Somogyi, P., Fritschy, J.M., Benke, D., Roberts, J.D., and Sieghart, W. (1996). The gamma 2 subunit of the GABA_A receptor is concentrated in synaptic junctions containing the alpha 1 and beta 2/3 subunits in hippocampus, cerebellum and globus pallidus. *Neuropharmacology* *35*, 1425–1444.
- Soriano, E., and Frotscher, M. (1994). Mossy cells of the rat fascia dentata are glutamate-immunoreactive. *Hippocampus* *4*, 65–69.
- Soriano, E., Cobas, A., and Fairén, A. (1986). Asynchronism in the neurogenesis of GABAergic and non-GABAergic neurons in the mouse hippocampus. *Brain Res.* *395*, 88–92.
- Soriano, E., Cobas, A., and Fairén, A. (1989a). Neurogenesis of glutamic acid decarboxylase immunoreactive cells in the hippocampus of the mouse. I: Regio superior and regio inferior. *J. Comp. Neurol.* *281*, 586–602.
- Soriano, E., Cobas, A., and Fairén, A. (1989b). Neurogenesis of glutamic acid decarboxylase immunoreactive cells in the hippocampus of the mouse. II: Area dentata. *J. Comp. Neurol.* *281*, 603–611.
- Sperk, G., Schwarzer, C., Tsunashima, K., Fuchs, K., and Sieghart, W. (1997). GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus I: immunocytochemical distribution of 13 subunits. *Neuroscience* *80*, 987–1000.
- Spigelman, I., Zhang, L., and Carlen, P.L. (1992). Patch-clamp study of postnatal development of CA1 neurons in rat hippocampal slices: membrane excitability and K⁺ currents. *J. Neurophysiol.* *68*, 55–69.
- Squarzone, P., Oller, G., Hoeffel, G., Pont-Lezica, L., Rostaing, P., Low, D., Bessis, A., Ginhoux, F., and Garel, S. Microglia Modulate Wiring of the Embryonic Forebrain. *Cell Rep.*
- Stence, N., Waite, M., and Dailey, M.E. (2001). Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia* *33*, 256–266.
- Stephan, H. (1983). Evolutionary trends in limbic structures. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *7*, 367–374.
- Stevens, B., Allen, N.J., Vazquez, L.E., Howell, G.R., Christopherson, K.S., Nouri, N., Micheva, K.D., Mehalow, A.K., Huberman, A.D., Stafford, B., et al. (2007). The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell* *131*, 1164–1178.

- Steward, O., and Falk, P.M. (1991). Selective localization of polyribosomes beneath developing synapses: a quantitative analysis of the relationships between polyribosomes and developing synapses in the hippocampus and dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* *314*, 545–557.
- Streit, W.J., Walter, S.A., and Pennell, N.A. (1999). Reactive microgliosis. *Prog. Neurobiol.* *57*, 563–581.
- Sunico, C.R., Portillo, F., González-Forero, D., and Moreno-López, B. (2005). Nitric-oxide-directed synaptic remodeling in the adult mammal CNS. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 1448–1458.
- Sunico, C.R., González-Forero, D., Domínguez, G., García-Verdugo, J.M., and Moreno-López, B. (2010). Nitric oxide induces pathological synapse loss by a protein kinase G-, Rho kinase-dependent mechanism preceded by myosin light chain phosphorylation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 973–984.
- Sur, C., Quirk, K., Dewar, D., Atack, J., and McKernan, R. (1998). Rat and human hippocampal alpha5 subunit-containing gamma-aminobutyric AcidA receptors have alpha5 beta3 gamma2 pharmacological characteristics. *Mol. Pharmacol.* *54*, 928–933.
- Suzuki, W.A., and Amaral, D.G. (1994). Topographic organization of the reciprocal connections between the monkey entorhinal cortex and the perirhinal and parahippocampal cortices. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *14*, 1856–1877.
- Svensson, M., and Aldskogius, H. (1993). Synaptic density of axotomized hypoglossal motoneurons following pharmacological blockade of the microglial cell proliferation. *Exp. Neurol.* *120*, 123–131.
- Swanson, L.W., and Cowan, W.M. (1975). Hippocampo-hypothalamic connections: origin in subicular cortex, not ammon's horn. *Science* *189*, 303–304.
- Swanson, L.W., and Cowan, W.M. (1977). An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J. Comp. Neurol.* *172*, 49–84.
- Swanson, L.W., Sawchenko, P.E., and Cowan, W.M. (1980). Evidence that the commissural, associational and septal projections of the regio inferior of the hippocampus arise from the same neurons. *Brain Res.* *197*, 207–212.
- Tamás, G., Lorincz, A., Simon, A., and Szabadics, J. (2003). Identified sources and targets of slow inhibition in the neocortex. *Science* *299*, 1902–1905.
- Tan, S.S., Kalloniatis, M., Sturm, K., Tam, P.P., Reese, B.E., and Faulkner-Jones, B. (1998). Separate progenitors for radial and tangential cell dispersion during development of the cerebral neocortex. *Neuron* *21*, 295–304.
- Taupin, P., and Gage, F.H. (2002). Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J. Neurosci. Res.* *69*, 745–749.
- Thomas, W.E. (1990). Characterization of the dynamic nature of microglial cells. *Brain Res. Bull.* *25*, 351–354.
- Trapp, B.D., Wujek, J.R., Criste, G.A., Jalabi, W., Yin, X., Kidd, G.J., Stohlman, S., and Ransohoff, R. (2007). Evidence for synaptic stripping by cortical microglia. *Glia* *55*, 360–368.
- Tremblay, M.-È., Lowery, R.L., and Majewska, A.K. (2010). Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience. *PLOS Biol* *8*, e1000527.

- Tremblay, M.-E., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., Bessis, A., and Nimmerjahn, A. (2011). The Role of Microglia in the Healthy Brain. *J. Neurosci.* *31*, 16064–16069.
- Tremblay, M.-È., Lecours, C., Samson, L., Sánchez-Zafra, V., and Sierra, A. (2015). From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. *Front. Neuroanat.* *9*, 45.
- Trinchieri, G., and Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 179–190.
- Tseng, K.Y., Chambers, R.A., and Lipska, B.K. (2009). The neonatal ventral hippocampal lesion as a heuristic neurodevelopmental model of schizophrenia. *Behav. Brain Res.* *204*, 295–305.
- Tyzio, R., Represa, A., Jorquera, I., Ben-Ari, Y., Gozlan, H., and Aniksztejn, L. (1999). The establishment of GABAergic and glutamatergic synapses on CA1 pyramidal neurons is sequential and correlates with the development of the apical dendrite. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 10372–10382.
- Tyzio, R., Ivanov, A., Bernard, C., Holmes, G.L., Ben-Ari, Y., and Khazipov, R. (2003). Membrane potential of CA3 hippocampal pyramidal cells during postnatal development. *J. Neurophysiol.* *90*, 2964–2972.
- Tyzio, R., Cossart, R., Khalilov, I., Minlebaev, M., Hübner, C.A., Represa, A., Ben-Ari, Y., and Khazipov, R. (2006). Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery. *Science* *314*, 1788–1792.
- Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., and Yamashita, T. (2013). Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat. Neurosci.* *16*, 543–551.
- Van Hoesen, G.W. (1995). Anatomy of the medial temporal lobe. *Magn. Reson. Imaging* *13*, 1047–1055.
- Van Hoesen, G., and Pandya, D.N. (1975). Some connections of the entorhinal (area 28) and perirhinal (area 35) cortices of the rhesus monkey. I. Temporal lobe afferents. *Brain Res.* *95*, 1–24.
- Van Hoesen, G., Pandya, D.N., and Butters, N. (1975). Some connections of the entorhinal (area 28) and perirhinal (area 35) cortices of the rhesus monkey. II. Frontal lobe afferents. *Brain Res.* *95*, 25–38.
- Vazdarjanova, A., and Guzowski, J.F. (2004). Differences in hippocampal neuronal population responses to modifications of an environmental context: evidence for distinct, yet complementary, functions of CA3 and CA1 ensembles. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 6489–6496.
- Vela, J.M., Dalmau, I., González, B., and Castellano, B. (1995). Morphology and distribution of microglial cells in the young and adult mouse cerebellum. *J. Comp. Neurol.* *361*, 602–616.
- Vida, I., Halasy, K., Szinyei, C., Somogyi, P., and Buhl, E.H. (1998). Unitary IPSPs evoked by interneurons at the stratum radiatum-stratum lacunosum-moleculare border in the CA1 area of the rat hippocampus in vitro. *J. Physiol.* *506 (Pt 3)*, 755–773.
- Villette, V., Guigue, P., Picardo, M.A., Sousa, V.H., Leprince, E., Lachamp, P., Malvache, A., Tressard, T., Cossart, R., and Baude, A. (2016). Development of early-born γ -Aminobutyric acid hub neurons in mouse hippocampus from embryogenesis to adulthood. *J. Comp. Neurol.* *524*, 2440.
- Vukovic, J., Colditz, M.J., Blackmore, D.G., Ruitenberg, M.J., and Bartlett, P.F. (2012). Microglia Modulate Hippocampal Neural Precursor Activity in Response to Exercise and Aging. *J. Neurosci.* *32*, 6435–6443.

- Wake, H., Moorhouse, A.J., Jinno, S., Kohsaka, S., and Nabekura, J. (2009). Resting Microglia Directly Monitor the Functional State of Synapses In Vivo and Determine the Fate of Ischemic Terminals. *J. Neurosci.* *29*, 3974–3980.
- Wakselman, S., Béchade, C., Roumier, A., Bernard, D., Triller, A., and Bessis, A. (2008). Developmental Neuronal Death in Hippocampus Requires the Microglial CD11b Integrin and DAP12 Immunoreceptor. *J. Neurosci.* *28*, 8138–8143.
- Walker, F.R., Beynon, S.B., Jones, K.A., Zhao, Z., Kongsui, R., Cairns, M., and Nilsson, M. (2014). Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: A review of the models, the signals and the mechanisms. *Brain. Behav. Immun.*
- Wang, Y.F., Gao, X.B., and van den Pol, A.N. (2001). Membrane properties underlying patterns of GABA-dependent action potentials in developing mouse hypothalamic neurons. *J. Neurophysiol.* *86*, 1252–1265.
- Weickert, C.S., and Weickert, T.W. (2016). What’s Hot in Schizophrenia Research? *Psychiatr. Clin. North Am.* *39*, 343–351.
- Wester, J.C., and McBain, C.J. (2016). Interneurons Differentially Contribute to Spontaneous Network Activity in the Developing Hippocampus Dependent on Their Embryonic Lineage. *J. Neurosci.* *36*, 2646–2662.
- Witter, M.P., and Amaral, D.G. (1991). Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *J. Comp. Neurol.* *307*, 437–459.
- Wolff, A.R., Cheyne, K.R., and Bilkey, D.K. (2011). Behavioural deficits associated with maternal immune activation in the rat model of schizophrenia. *Behav. Brain Res.* *225*, 382–387.
- Wu, L.-J., and Zhuo, M. (2008). Resting Microglial Motility Is Independent of Synaptic Plasticity in Mammalian Brain. *J. Neurophysiol.* *99*, 2026–2032.
- Wu, C.H., Wen, C.Y., Shieh, J.Y., and Ling, E.A. (1992). A quantitative and morphometric study of the transformation of amoeboid microglia into ramified microglia in the developing corpus callosum in rats. *J. Anat.* *181 (Pt 3)*, 423–430.
- Xu, J., Zhu, L., He, S., Wu, Y., Jin, W., Yu, T., Qu, J.Y., and Wen, Z. (2015). Temporal-Spatial Resolution Fate Mapping Reveals Distinct Origins for Embryonic and Adult Microglia in Zebrafish. *Dev. Cell* *34*, 632–641.
- Xu, J., Wang, T., Wu, Y., Jin, W., and Wen, Z. (2016). Microglia Colonization of Developing Zebrafish Midbrain Is Promoted by Apoptotic Neuron and Lysophosphatidylcholine. *Dev. Cell* *38*, 214–222.
- Xu, Q., Cobos, I., De La Cruz, E., Rubenstein, J.L., and Anderson, S.A. (2004). Origins of cortical interneuron subtypes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 2612–2622.
- Yamada, J., and Jinno, S. (2013). Novel objective classification of reactive microglia following hypoglossal axotomy using hierarchical cluster analysis. *J. Comp. Neurol.* *521*, 1184–1201.
- Yamada, J., Hayashi, Y., Jinno, S., Wu, Z., Inoue, K., Kohsaka, S., and Nakanishi, H. (2008). Reduced synaptic activity precedes synaptic stripping in vagal motoneurons after axotomy. *Glia* *56*, 1448–1462.
- Yang, T.-T., Lin, C., Hsu, C.-T., Wang, T.-F., Ke, F.-Y., and Kuo, Y.-M. (2012). Differential distribution and activation of microglia in the brain of male C57BL/6J mice. *Brain Struct. Funct.* *218*, 1051–1060.

- Yukie, M. (2000). Connections between the medial temporal cortex and the CA1 subfield of the hippocampal formation in the Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *J. Comp. Neurol.* *423*, 282–298.
- Zarnowska, E.D., Keist, R., Rudolph, U., and Pearce, R.A. (2009). GABAA Receptor $\alpha 5$ Subunits Contribute to GABAA,slow Synaptic Inhibition in Mouse Hippocampus. *J. Neurophysiol.* *101*, 1179–1191.
- Zhan, Y., Paolicelli, R.C., Sforazzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., Vyssotski, A.L., Bifone, A., Gozzi, A., Ragozzino, D., et al. (2014). Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat. Neurosci.* *17*, 400–406.
- Zhang, Z.J., and Reynolds, G.P. (2002). A selective decrease in the relative density of parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampus in schizophrenia. *Schizophr. Res.* *55*, 1–10.
- Zhang, L., Spigelman, I., and Carlen, P.L. (1991). Development of GABA-mediated, chloride-dependent inhibition in CA1 pyramidal neurones of immature rat hippocampal slices. *J. Physiol.* *444*, 25–49.
- Zhang, M., Xu, G., Liu, W., Ni, Y., and Zhou, W. (2012). Role of Fractalkine/CX3CR1 Interaction in Light-Induced Photoreceptor Degeneration through Regulating Retinal Microglial Activation and Migration. *PLOS ONE* *7*, e35446.
- Zhang, R., Sun, L., Hayashi, Y., Liu, X., Koyama, S., Wu, Z., and Nakanishi, H. (2010). Acute p38-mediated inhibition of NMDA-induced outward currents in hippocampal CA1 neurons by interleukin-1 β . *Neurobiol. Dis.* *38*, 68–77.
- Zhu, F., Zhang, L., Ding, Y., Zheng, Y., and Zhao, J. Neonatal intrahippocampal injection of lipopolysaccharide induces deficits in social behavior and prepulse inhibition and microglial activation in rats: Implication for a new schizophrenia animal model. *Brain. Behav. Immun.*
- Ziv, Y., Ron, N., Butovsky, O., Landa, G., Sudai, E., Greenberg, N., Cohen, H., Kipnis, J., and Schwartz, M. (2006). Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat. Neurosci.* *9*, 268–275.

The Hippocampus Book.

Achevé d'imprimer à Mèrignac par
EDITIONS BERGERET
by **COPYMÉDIA** 05 56 99 50 22
23 rue Francisco Ferrer - 33700 Mèrignac
www.editions-bergeret.com
Dècembre 2016