HAL
open science

Implication des cellules microgliales dans le développement des réseaux synaptiques du néocortex somatosensoriel

Coralie-Anne Mosser

To cite this version:

Coralie-Anne Mosser. Implication des cellules microgliales dans le développement des réseaux synaptiques du néocortex somatosensoriel. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCB074 . tel-02511079

HAL Id: tel-02511079

https://theses.hal.science/tel-02511079

Submitted on 18 Mar 2020

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 DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Spécialité Neurosciences

École Doctorale 562 : Bio Sorbonne Paris Cité

Département Développement, Génétique, Reproduction, Neurobiologie et Vieillissement

Centre Universitaire des Saints-Pères / Laboratoire de Neurophysiologie et Nouvelles microscopies

Implication des Cellules Microgliales dans le Développement des Réseaux Synaptiques du Néocortex Somatosensoriel

Par Coralie-Anne Mosser

Dirigée par Étienne Audinat, DR

Présentée et soutenue publiquement le 28 septembre 2018,

Devant un jury composé de :

Pascal Legendre, DR (Rapporteur)

Lauriane Ulmann, DR (Rapportrice)

Claire Legay, PU (Présidente du jury)

Richard Robitaille, PU (Examinateur)

Anne Roumier, DR (Examinatrice)

Remerciements

Avant tout chose, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer ces 4 années de travail. Je remercie chaleureusement **Lauriane Ulmann** et **Pascal Legendre** d'avoir accepté de poser leur regard d'experts sur mes recherches et d'en être les rapporteurs, et ce malgré les délais très courts que je leur ai imposés. Je remercie **Richard Robitaille**, **Anne Roumier** et **Claire Legay** d'avoir accepté si gentiment de faire partie de ce jury. Un merci particulier à Richard pour l'organisation de l'IAS, je suis très heureuse d'avoir eu la chance de participer à cette fabuleuse école.

Cette thèse a été rendue possible grâce au soutien financier du DIM Cerveau et Pensée de la Région Île-de-France durant 3 ans, et grâce à la Fondation pour la Recherche Médicale qui m'a octroyé une allocation doctorale de quatrième année (FDT20170 739030).

Un proverbe africain que j'affectionne raconte que « seul, on va plus vite, ensemble on va plus loin ». Quoiqu'il constitue par certains côtés une aventure solitaire, l'accomplissement d'une thèse doit beaucoup à bien des gens. L'occasion m'est donnée ici de remercier l'ensemble des personnes qui m'ont inspirée et dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifeste pour mes travaux m'ont accompagné pendant ces 4 dernières années.

Dans ces pérégrinations intellectuelles et émotionnelles, ma reconnaissance va d'abord à celui qui a dirigé mon travail et n'a pas ménagé ses conseils et ses encouragements, **Étienne Audinat**. Mille mercis pour ta patience, ta disponibilité et ton soutien. Malgré les hauts et quelques inévitables bas, je n'aurais pas pu rêver meilleur chef pour apprendre le métier de chercheur. Merci de m'avoir enseigné l'art de la réflexion scientifique ; je réalise avec un peu de recul à quel point j'étais immature, scientifiquement parlant, en arrivant au labo il y a 4 ans. J'ai reçu une excellente formation de ta part, et j'ai aussi trouvé un mentor exceptionnel qui n'a jamais manqué de m'aider et me donner des conseils avisés. Merci pour ton enthousiasme à me transmettre ton expertise, merci pour ta bienveillance ; et merci de m'avoir laissé tant d'autonomie. Je m'efforcerai de toujours conserver cette rigueur que tu m'as inculquée. Je suis fière d'avoir appris l'électrophysiologie avec toi, je ne peux qu'espérer devenir une chercheuse comme toi à l'avenir. Enfin, merci Étienne de m'avoir fait confiance, et de m'avoir permis de garder mon set-up à Paris pour cette dernière année. Je me souviendrai de nos paris (gagnés et perdus) concernant les solutions intra et la chambre de patch (merci pour le Lanson !).

La pression à publier, à avoir un impact et briller au sein de sa communauté, et la perspective par la suite de devoir décrocher des financements et courir après la titularisation, combinée à des expériences parfois ratées et au travail solitaire m'a souvent poussée à tenir un discours quelque peu pessimiste. J'ai toujours pu compter sur **Serge Charpak** pour me remettre les idées en place et me rappeler que notre travail est aussi une affaire de beauté. Explorer de nouvelles idées, s'attaquer à l'inconnu, et finalement comprendre : c'est un privilège. Merci Serge pour toutes ces discussions inspirantes, galvanisantes et salvatrices. Merci d'avoir pris le temps d'un déjeuner pour en discuter, et merci de t'être soucié autant de moi depuis qu'Etienne a déménagé. Merci pour cette merveilleuse dernière retraite de labo, et ces derniers mois durant lesquels j'ai vraiment été intégrée à ton équipe, je suis très fière de faire partie des Charpakitos.

J’adresse également mes remerciements à **Maria-Cécilia Angulo**. Merci pour ta disponibilité, et d’avoir toujours été à l’écoute et compréhensive.

J’exprime ma profonde gratitude à tous les membres actuels et passés du laboratoire pour nos discussions enrichissantes, l'aide aux expériences et tous les bons moments que nous avons passés ensemble, au labo, pendant les manips ou autour d’un déjeuner Top Chef, et lors des retraites, en Italie, en Bourgogne ou encore à Val d’Isère.

En presque 5 ans, j’ai vu de nombreuses personnes arriver et quitter l’équipe. Tout d’abord, un grand merci aux membres de l’U603, ex-U1128, **Isabelle Arnoux** et **Céline Bidoret**. Merci infiniment Isabelle du temps que tu m’as consacré, alors que tu rédigeais ta thèse, pour me former à la préparation de tranches et au patch-clamp, alors que j’étais totalement novice en électrophysiologie. Merci pour ta patience exemplaire et tes encouragements. Tu as été un modèle pour moi dès le début, tant pour les manips que pour le reste. Merci Céline pour nos discussions scientifiques et non-scientifiques, ton soutien et ton amitié, c’est toujours un plaisir de te voir autour d’un verre. On ne s’est pas côtoyées très longtemps, mais je remercie également Safia et Claire pour les moments partagés ensemble. I now switch in English to thank the Audinat’s team past members **Weida Shen**, **Sofia Baptista**, **Ljiljana Nikolic** and **Paola Nobili**. My dear Weida, you deserve huge thanks for being such a spectacular labmate and for your positive attitude that never failed to bring a pleasant atmosphere in the lab! I’m very glad we started to work in Etienne’s team at the same time; it was a real pleasure to share all these years with you (and mini journal clubs on Monday mornings!). Thanks for helping me every time I needed to do some set-up troubleshooting. It was amazing working with you, and doing groceries in Tang Brothers together. I’ll never forget all our laughter, especially the “pipi sauvage” story! My dear Ljilja, I miss hearing you calling me through the lab by the numerous nicknames you invented. “Coco mademoiselle” wants to thank you for all the laughs we shared; it is so calm here since you left. “C’est pas possible!” as you would say. Thank you for all the beautiful dinners you organized. It was great to patch next to you, and also next to you, Sofia, my dear office neighbor. Thanks for all our discussion; it was really nice working with you, in Paris or in Bilbao. My dear Paola, we laughed a lot as well, it was really nice to share our office for these last few months of 2017 (I miss Herminion picture now!). **Manon**, seule représentante actuelle de l’ancienne équipe, je suis très heureuse d’avoir travaillé avec toi, merci pour tous les génotypages, ainsi que pour nos rires et discussions animées à l’heure du déjeuner, et pour ton soutien ces 9 derniers mois.

Je remercie tous les stagiaires que j'ai (co-)encadrés, **Sophie**, **Pamela**, **Anne**, et en particulier mon excellent étudiant de médecine-science, **Marin**. Je suis ravie d'avoir eu la chance de te former au patch, et tu m'as beaucoup appris en termes de pédagogie (l'histoire de l'offset est devenue une belle légende). Je sais déjà que tu feras une brillante thèse de science, quand tu trouveras le temps de la commencer (pendant l'internat ?). C'était un plaisir de rédiger manuscrit de thèse et rapport de M2 côte à côte cet été.

Je remercie chaleureusement nos collaboratrices **Sonia Garel**, **Morgane Thion** et **Pauline Grisel**, ainsi que **Céline Cansell**. J'ai particulièrement apprécié ta présence Céline lors des nuits passées à patcher des cellules microgliales dans le noyau arqué, merci pour ton amitié.

Ces années n'auraient pas été aussi belles sans les pot-llègues suivants. Un immense merci à **Maddalena Balia**, grâce à qui j'ai immédiatement été intégrée au labo pendant la retraite à Otranto. Merci pour ta sollicitude et ton amitié, et merci de m'avoir si bien épaulée durant mon stage de master, ma thèse, et à présent dans mes recherches de post-doc. Je suis très heureuse et chanceuse d'avoir partagé tous ces moments avec toi, du confocal des Saints-Pères à ton labo à Londres. Merci pour ta succulente cuisine qui réchauffe le cœur, ainsi que pour les tutos sushis. J'espère qu'on se retrouvera d'ici quelques années pour collaborer, entre OPCs, interneurones et microglie ! Je dois aussi énormément aux benjamins de l'équipe Charpak. Un immense merci à **Morgane Roche** et **Ali-Kémal Aydin** d'avoir été si présent ces 9 derniers mois, en absence de chef et d'équipe. Vous savez tout le bien que je pense de vous, je suis extrêmement heureuse de vous compter parmi mes amis proches. Merci pour votre soutien sans faille, merci de m'avoir supportée même dans les mauvais jours, fait découvrir l'escalade, couvert de chocolats à Pâques et de m'avoir gâtée comme jamais pour mon anniversaire. Et merci pour vos petits mots drôles et réconfortants, vous êtes la meilleure équipe que j'aurais pu espérer cette dernière année. Morgane, tu es une jeune femme formidable, et je ne doute pas un instant de ta réussite future. Merci d'avoir été là dans tous les moments difficiles. J'espère pouvoir te rendre la pareille l'année prochaine. Je garderai précieusement cette petite boîte de Pétri, symbole de la sagesse naissante ! Ali-Ké, merci pour les 172 kebabs sur ma déclaration fiscale qui m'a valu un regard interloqué des responsables financiers de Paris Descartes. Tu vas être déçu car je ne te consacrerai pas une page complète de remerciement. Non que tu ne la mérites point, mais parce que les mots ne sauraient suffire à la reconnaissance que j'ai envie de t'exprimer. Tu m'as beaucoup appris, et j'ai adoré nos discussions scientifiques (parlons space-clamp et python) comme non-scientifiques. Merci à mes chers collègues post-docs **Davide Boido** et **Ravi Rungta.** Davide, je te remercie pour ta

gentillesse hors norme, ta générosité, et les gâteaux plus délicieux les uns que les autres (enfin, pour avoir fait la vaisselle. Merci Elena !). Merci Ravi d'être venu me tenir compagnie en H315bis sur ces derniers mois, j'ai beaucoup apprécié nos discussions, et merci pour ton aide avec le filament de l'étireuse. On en a vaporisé quelques-uns, merci pour ces fous rires partagés ! Merci à **Yannick Goulam** et **Emmanuelle Chaigneau** pour leur aide en ce qui concerne les logiciels. Je te remercie Emmanuelle d'avoir partagé tes connaissances des spiny stellate avec moi. Yaya, je n'oublierai pas nos cours de yoga. Je remercie évidemment les membres présents et passés de l'équipe de MaCé, **David Orduz**, **Fernando Ortiz**, **Chloé Habermacher**, **Najate Benamer**, **Blandine Manot-Saillet** et **Domiziana Ortolani**. Fernando et David, merci pour votre bonne humeur, vos excellents conseils en matière d'analyse ou de statistiques, c'était un vrai plaisir de passer quelques années avec vous. Merci Chloé et Najate pour tous ces bons moments partagés, et pour l'entraide quand il s'agissait d'aller injecter du tamoxifène le dimanche. Ma petite Blandine, c'était un plaisir de te voir régulièrement passer aux Saints-Pères ces derniers mois, merci pour ton rire si communicatif ! Merci enfin à **Amelyne**, pour le génotypage, la gestion des colonies et d'avoir si bien veillé sur le labo pendant 3 ans.

Ces années de thèse n'auraient pas été aussi belles sans les doctorants voisins du 3ème étage des Saints-Pères : **Jorge**, **Merouann**, et surtout les cartésiens **Alexis** et **Flavien**. Les copains, je suis très heureuse de vous avoir rencontré, c'était un plaisir de partager ces week-ends de manips, pauses café et afterworks en votre compagnie ; merci pour votre amitié.

Merci aux enseignants-chercheurs **Laurence Bourgeais** et **Federico Trigo** aux côtés de qui j'ai tant appris durant le monitorat. Fede, je ne pourrais jamais assez te remercier de me permettre d'utiliser aussi régulièrement ton slicer depuis le déménagement de celui que j'utilisais à Montpellier. Merci à **Boris Lamotte d'Incamps** et **Philippe Ascher** pour nos discussions très plaisantes durant l'heure de coupe matinale. Merci aussi à **Valéria Zampini** pour le prêt de son slicer en début d'année.

Merci au personnel de l'animalerie des Saints-Pères grâce à qui notre travail quotidien est facilité, en particulier à **Aurélien Petitcollin**.

J'adresse également mes remerciements à **Hervé Daniel**, responsable de l'excellent master de Neurosciences et Signalisation cellulaire de l'Université Paris Sud, d'avoir éclairé mes choix aux principales étapes de mon parcours universitaire, et d'être aussi soucieux du futur de ses étudiants. Ma volonté de poursuivre mes études en Neurosciences et en particulier d'effectuer

une thèse de physiologie est née grâce aux excellents enseignements de **Micaela Galante**, merci pour ton enthousiasme contagieux.

J'ai eu la chance de rencontrer de nombreux scientifiques passionnés dans le cadre de séminaire et colloques. Un merci spécial à **Mickaël Degoulet** pour son amitié, ainsi qu'à **Christophe Bernard**, à qui je dois de beaux souvenirs et une côte flottante fêlée.

Un grand merci à mes amis, toujours présents dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci d'abord à mes chers P18 du Magistère de Biologie et Biotechnologie, **Kelly** mon binôme adoré, **Arthur** et son humour décapant, **Stéphanie** grâce à la tradition des week-ends d'anthologie ne s'éteint pas, **Benjamin** notre futur formidable médecin, et **Chouf**, **Mèg**, **Lulu**, **Saber**, **Solal**, **Wilax**, **Agnès**, **Lucie**, **Séverine**, **Jeff** et **Gaby**. Merci à mes thésards **Quentin** et **Fred**, pour le soutien et la compréhension mutuelle. Merci à la bande du PFC **Jeff**, **Alice**, **Isabelle, François**, **Coralie**, **Ivan**, **Essinev**, **Quentin**, **Natha**, **Julie**, **Pierre**, **Marinou**, **Flo**, ainsi que tous les autres, pour ces belles soirées et week-ends à la campagne, pour m'avoir chanté ce refrain « quand soutiens-tu cette thèse ? » et encouragée sans faille, malgré parfois une certaine incompréhension. Un merci tout particulier à Jeff, toujours exceptionnellement positif et protecteur, à Coralie pour ses jolis messages d'encouragements ces derniers mois, et à Zaza pour nos conversations réconfortantes. Merci spécial à Natha pour la livraison express de kneidler à minuit et la compagnie alors que je patchais des cellules microgliales dans l'hypothalamus ! À toi ma chère **Marine**, merci ces moments sportifs privilégiés et nos nombreuses conversations fascinantes. Merci aux copains de primaire, du collège et du lycée qui se reconnaîtront. Un shalala du fond du cœur à mes très chers **Didi** et **Rémi**.

Un immense merci à mes frères et sœur de cœur **Vincent**, **Gabriel** et **Lise**, l'amitié que vous me portez est une vraie source d'inspiration. Ma Lise, merci d'avoir pris aussi bien pris soin de moi pendant toutes ces années, et d'avoir toujours été présente dans les moments difficiles. Gab, poète casse-cou, chanteur-compositeur, merci d'avoir toujours compris qui j'étais, merci pour ta tendresse, et de ne jamais m'avoir laissé tomber depuis 15 ans. Vincent, mon partenaire de patch, depuis cette formation à l'expérimentation animale durant laquelle notre fraternelle amitié est née, tu as été d'un altruisme et d'un soutien sans pareil. Je te suis très reconnaissante pour tout ce que tu m'as appris, que ce soit en science ou en rap US, et je n'oublierai jamais nos passionnantes discussions, des Saints-Pères à la Butte aux Cailles. Je te remercie aussi pour ton aide inestimable dans l'analyse de données et la répétition avant les

confs. Merci de m'avoir supportée de Montpellier à San Diego, et de m'avoir fait visiter New York. J'espère qu'un jour nous parviendrons à réaliser nos rêves (comme monter un labo pour étudier la dynamique des cellules microgliales dans CA2 !).

Mille mercis à mes grands-mères, oncles, tantes, marraine, cousin(e)s ; et en particulier à mes chers **Jean-Do** et **Domi**, merci pour l'accueil lors des congrès à Strasbourg.

Durant mes études, la patience et la compréhension de ma famille ont parfois été mises à rude épreuve. Mes pensées vont à mes parents **Cécile** et **Benoît**, que j'admire énormément, et de qui j'ai, sans aucun doute, hérité la passion pour la Recherche. Vous représentez des repères et inspirations exemplaires, et je vous remercie infiniment de votre soutien indéfectible. Merci d'avoir éveillé ma curiosité scientifique. **Laureline** et **Raphaël**, je vous remercie tendrement de supporter votre sœur aînée malgré tout. J'ai également eu la chance de trouver une belle-famille incroyable, merci **Valérie**, **Thomas**, **Jacques** et **Marianne** pour votre accueil et votre générosité.

Enfin, à celui qui partage ma vie depuis le début de cette thèse, ma reconnaissance ne peut être écrite. **Simon**, je te remercie infiniment pour ton amour et ta présence irremplaçable à mes côtés. Merci pour ton intérêt sincère dans mon travail, et pour ta confiance en moi. Je te suis éternellement reconnaissante pour ton soutien inconditionnel, ton optimisme dans les moments de doute, ta patience et ton dévouement, qui n'ont jamais manqué de m'apporter bonheur et force pour surmonter les difficultés. Je suis impatiente d'écrire le prochain chapitre de nos aventures.

Je dédie ce travail à Louis Michel et Jean-Louis Mosser,

mes grands-pères

"As a journalist I'm supposed to be impartial, I know. But today I'll confess, I don't love every cell the same. I have a very favorite kind, the microglia […] Microglia are like soldiers and policemen, chameleons and spiders, housekeepers, gardeners, electricians, and garbage collectors. Microglia can be active or resting, branched or blobby, harmful or protective. Are you in love yet?"

Virginia Hughes

Table des matières

Remerciements **1**

Table des matières **12**

Résumé **15**

Abstract **17**

Liste des abréviations **19**

Table des illustrations **22**

Avant-propos **24**

Chapitre 1 : Introduction **26**

I. La microglie dans tous ses états 27
1. Le large spectre d'« activation » microgliale 27
2. La signalisation « *on* » / « *off* » 28
3. La voie de signalisation fractalkine/CX3CR1 29
4. Surveillance constante et dynamique du SNC adulte 31

II. Origine et développement de la microglie 33
1. Des envahisseurs venus d'ailleurs 33
2. Colonisation du parenchyme cérébral 37

III. Contrôle microglial de la mort et de la survie développementale des neurones 42
1. Nettoyage et induction de l'apoptose développementale 42
2. Soutenir la survie et la prolifération des neurones en développement 45

IV. Régulation microgliale du développement des réseaux synaptiques 47
1. Assemblage des circuits neuronaux 47
2. Élagage synaptique 51
3. Formation et maturation fonctionnelle des synapses 55

V. Conséquences au long terme des fonctions microgliales pendant le développement sur les neurones : la microglie est-elle le chaînon manquant dans les pathologies développementales ? 57

VI. Le cortex somatosensoriel primaire de rongeur comme modèle d'étude du développement synaptique 62
1. Des vibrisses au cortex somatosensoriel primaire, une somatotopie parfaitement conservée 62

2. Organisation cellulaire et fonctionnelle des tonneaux 65
3. Développement et période critique de plasticité développementale du cortex en champs de tonneaux 71
4. Développement des synapses thalamocorticales des tonneaux 72
VII. Colonisation du cortex en champs de tonneaux par les cellules microgliales lors du développement postnatal et maturation de la voie thalamocorticale 84

Chapitre 2 : Résultats 89

I. *Microglial BDNF promotes the functional maturation of thalamocortical synaptic networks* 90
1. Présentation de l'article 91
2. Introduction 93
3. Experimental procedures 94
4. Results 98
5. Discussion 106
II. *Microglia and prenatal inflammation regulate local and horizontal wiring of inhibitory circuits* 117
1. Présentation de l'article 118
2. Introduction 120
3. Experimental procedures 120
4. Results 125
5. Discussion 131

Chapitre 3 : Discussion générale et perspectives 138

I. Développement postnatal, microglie et BDNF 139
II. MIA, microglie et maladies neuropsychiatriques 146
III. Conséquences divergentes d'une perturbation pré- ou post-natale des cellules microgliales au niveau des réseaux inhibiteurs 151

Références 155

Annexe : *"Microglia in CNS development: shaping the brain for the future"* 177

Résumé

La microglie désigne l'ensemble des macrophages résidents du système nerveux central (SNC). Longtemps considérées comme étant actives uniquement en conditions pathologiques, les cellules microgliales sont pourtant essentielles à l'activité physiologique du SNC. En particulier, pendant la formation du SNC, elles régulent l'apoptose et la survie neuronales, et interagissent directement avec les synapses en les éliminant, promouvant leur formation ou en régulant leur activité. Toutefois, les mécanismes microgliaux impliqués dans la mise en place et la maturation fonctionnelle des circuits corticaux pendant le développement ne sont pas intégralement élucidés. Afin de mieux comprendre le rôle de la microglie dans le développement cortical, nous avons utilisé le système des champs de tonneaux du cortex somatosensoriel de la souris, et combiné des manipulations *in vivo* avec des approches électrophysiologique, optogénétique, pharmacologique et histologique sur tranches de cerveaux de souris génétiquement modifiées.

Dans une première étude, nous nous sommes intéressés aux conséquences de l'arrivée de la microglie à proximité des zones de terminaison des fibres thalamiques (les centres des tonneaux) dans le cortex somatosensoriel au cours de la première semaine postnatale. Nous avons exploré une potentielle influence de la microglie sur l'évolution des propriétés fonctionnelles des synapses thalamocorticales et de l'inhibition disynaptique associée (inhibition antérograde ou *feedforward*). Nos résultats montrent qu'une déplétion de la microglie pendant la première semaine postnatale entraîne un retard de maturation fonctionnelle de la connexion thalamocorticale excitatrice monosynaptique et de l'inhibition disynaptique au niveau des cellules principales de la couche 4 (PC) entre les 10ème et 12ème jours postnataux (P10-12). Nous avons ensuite testé si le facteur neurotrophique BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) pouvait être la molécule microgliale impliquée dans la maturation de ces synapses corticales. L'utilisation de la lignée $CX3CR1^{CreER/+}::BDNF^{lox/lox}$ nous a permis de montrer que l'absence de BDNF microglial entraîne aussi un déficit de maturation fonctionnelle des connexions excitatrices monosynaptiques et inhibitrices disynaptiques thalamocorticales entre P10-12 et que ce déséquilibre entre excitation et inhibition perdure chez les jeunes adultes. Nous avons donc identifié le BDNF comme un facteur microglial clé dans la maturation des circuits thalamocorticaux.

Dans une deuxième étude, nous avons examiné les conséquences de perturbations de la microglie au cours du développement embryonnaire sur la mise en place des réseaux corticaux. L'induction d'une activation immunitaire maternelle (MIA) par injection de

lipopolysaccharide (LPS) bactérien ou la déplétion de la microglie aux stades embryonnaires modifie la répartition laminaire des interneurones inhibiteurs exprimant la parvalbumine (PV) – cellules responsables de l'inhibition *feedforward* – dans le cortex jusqu'à P20. Nos données fonctionnelles révèlent que ces protocoles de MIA et de déplétion induisent une augmentation de l'inhibition périsomatique des PC à P20, ainsi qu'une exubérance de l'inhibition latérale entre les tonneaux, dépendante des interneurones PV. Cette inhibition exacerbée ne perdure pas et nos enregistrements chez l'adulte indiquent au contraire un affaiblissement des synapses inhibitrices entre les interneurones PV et les PC. Nous postulons donc que les cellules microgliales sont le chaînon manquant entre des stimulations immunitaires, telles qu'elles peuvent se produire durant une inflammation pendant la grossesse, et l'augmentation du risque de développer des pathologies neurodéveloppementales.
Ainsi, nos résultats mettent en exergue le rôle crucial de la microglie dans le développement des réseaux neuronaux corticaux pendant la période périnatale.

Mots-clés

Cellules microgliales, synapse thalamocorticale, interneurones inhibiteurs, cortex somatosensoriel primaire, développement postnatal, inhibition antérograde, activation immunitaire maternelle, AMPA, NMDA, GABA, BDNF, enregistrements électrophysiologiques, optogénétique

Abstract

Microglial cells are a population of specialized macrophages residing in the CNS only. They have long been studied solely under pathological contexts and were thought to be active only upon homeostatic disturbance. However, over the last decade, they have been increasingly recognized to be essential players in the physiological functioning of the CNS. Specifically, during the CNS formation, microglia has been shown to regulate apoptosis and neuronal survival. They are also able to directly interact with synapses, by eliminating supernumerary and inappropriate connections, by promoting synapse formation or by regulating their activity. Yet mechanisms by which microglia influence wiring and functional maturation of cortical are not fully understood.

To assess the role of microglia in cortical development, we used the barrel field as a model of neuronal development and we combined *in vivo* manipulations together with electrophysiology, optogenetics, pharmacologic and histologic approaches on brain slices of genetically-engineered mice.

We first explored the consequences of microglia arrival near the terminals of thalamic afferents (center of the barrels) in the primary somatosensory cortex during the first postnatal week. We tested the impact of microglia on the development of functional properties of thalamocortical synapses and associated disynaptic feedforward inhibition. By selectively depleting microglia at early postnatal days, we show that microglia depletion during the first postnatal week delays the functional maturation of both monosynaptic thalamocortical synapse and feedforward inhibition of layer 4 principal cells of the barrel cortex (PC) up to the 10th and 12th postnatal days (P10-12). To identify the mechanism underlying this process, we used the $CX3CR1^{CreER/+}::BDNF^{lox/lox}$ mouse line allowing the conditional deletion of microglial BDNF during the first postnatal week. Our recordings indicate that the absence of microglial BDNF, leads to a deficit in the functional maturation of both monosynaptic excitatory and disynaptic inhibitory thalamocortical connections between P10-12, and this unbalance between excitation and inhibition persists up to the end of the first postnatal month. We therefore identified microglial BDNF as a key factor of the maturation of thalamocortical circuits.

In a second study, we investigated the consequences of microglia dysfunction during embryonic development on cortical networks wiring. Maternal immune activation (MIA) triggered by bacterial lipopolysaccharide (LPS) injections modifies the laminar distribution of parvalbumin-expressing inhibitory interneurons (PV) – key actors in neuropsychiatric disease

– in the cortex until P20. Our functional data revealed that these MIA and depletion protocols lead to an increase of layer 4 PC perisomatic inhibition at P20, as well as an exuberance of lateral inhibition between barrels supported by PV interneurons. This increased inhibition does not last and our recordings in adult mice show that, on the opposite, MIA and early microglia depletion result in weaker inhibitory synapses at P60. To conclude, we postulate that microglial cells are the missing link between maternal immune challenge and a higher risk of developing neurodevelopmental pathologies, like autism or schizophrenia.
Our results highlight the crucial role of microglial cells in neuronal network development during the perinatal period.

Keywords

Microglial cells, thalamocortical synapse, inhibitory interneurons, primary somatosensory cortex, postnatal development, feedforward inhibition, maternal immune activation, AMPA, NMDA, GABA, BDNF, electrophysiological recordings, optogenetics

Liste des abréviations

5-HT3aR : récepteur à la sérotonine 3a

AHP : after hyperpolarization

AMPA : α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate

ATP : adenosine-5'-triphosphate

BDNF : brain-derived neurotrophic factor

CD11b : ou ITGAM, integrin alpha M

CGL : corps géniculé latéral

ChIP-seq : chromatin immunoprecipitation followed by sequencing

ChR2 : channelrhodopsin 2

Cm : capacitance membranaire

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

Cre : Recombinase Cre

CSF1 ou M-CSF : macrophage colony-stimulating factor

CSF1R : Récepteur pour le CSF1

CX3CR1 : CX3C chemokine receptor 1

DAMP : danger-associated molecular pattern

DAP12 : DNAX adaptor protein-12

DTR : diphteria toxin receptor

E : embryonic day

EGTA : ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

EPSC/EPSP : excitatory post-synaptic current/potential

eYFP : enhanced yellow fluorescent protein

GABA : acide γ-aminobutyrique

GAD67 : isoforme 67 de la glutamate decarboxylase

GDP : GABA-mediated giant depolarizing potential

GFAP : glial fibrillary acidic protein

GFP : green fluorescent protein

GM-CSF : granulocyte/macrophage colony-stimulating factor

GTP : guanosine triphosphate

KCC2 : cotransporteur K^+-Cl^- isoforme 2

Kdr : canaux potassiques sensibles au potentiel responsables des courants sortants

Kir : canaux potassiques sensibles au potentiel responsables des courants entrants

KO : knock-out

I_h : hyperpolarization-activated-current

Iba1 : ionized calcium-binding adaptator molecule 1

IFN : interféron

IGF1 : insulin growth factor 1

IL : interleukine

IPSC/IPSP : inhibitory postsynaptic current/potential

IRF : facteur de regulation de l'interféron

Lhx6 : LIM Homeobox 6

LPS : lipopolysaccharide

LTD : long-term depression

LTP : long-term potentiation

LSFM : light-sheet fluorescence microscopy

LSPS : laser-scanning photoactivation

MAPK : mitogen-activated protein kinases

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1

Mecp2 : methyl-CpG binding protein 2

mEPSC : miniature excitatory post-synaptic current

MHCII : major histocompatibility complex class II

MIA : activation immunitaire maternelle

MIF : Macrophage migration inhibitory factor

MIP-1alpha : macrophage inflammatory protein-1alpha

MMP : métalloprotéinase matricielle

M-CSF : macrophage colony-stimulating factor

mV : millivolt

NBQX : 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline-2,3-dione

Ncx : sodium-calcium exchanger

NGF : nerve growth factor

NKCC1 : cotransporteur Na^+-K^+-Cl^- isoforme 1

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NMDG : N-méthyl-D-glucamine

NO : oxyde nitrique

P : postnatal day

P2X : récepteur purinergique ionotropique

P2Y : récepteur purinergique métabotropique

pA : pico-ampère

PAMP : pathogen-associated molecular pattern

PBS : phosphate buffered saline

PCD : programmed cell death

PCR : polymerase chain reaction

PDGF : platelet-derived growth factor

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase

PGE_2 : prostaglandine E2

POA : preoptic area

Poly(I:C) : acide polyriboinosinique polyribocytidilique

POm : noyau posteriomédial du thalamus

PPD : paired-pulse depression

PPF : paired-pulse facilitation

PPR : paired-pulse ratio

PrV : noyau rostral principal du tronc cérébral

PSD-95 : postsynaptic density protein 95

PV : parvalbumine

Rs : résistance en série

Rin : résistance d'entrée

ROS : espèces réactives de l'oxygène

S1 : cortex somatosensoriel primaire

sEPSC : spontaneous excitatory post-synaptic current

sIPSC : spontaneous inhibitory post-synaptic current

SNAP25 : Synaptosomal-associated protein 2

SNC : Système nerveux central

SpV : : noyau spinal caudal du tronc cérébral

SPN : subplate neurons

SST : somatostatine

TCA : thalamocortical axons

TEP : tomographie par émission de positons

TGF-β : transforming growth factor beta

Th : lymphocytes T helper

TLR : Toll-like receptor

TNFα : tumor necrosis factor α

TNFR1 : récepteur au TNFα

TREM2 : triggering receptor expressed by myeloid cells-2

TrkB : tropomyosin related kinase B

TSA : troubles du spectre autistique

TTX : tetrodotoxin

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

VB ou VPM : ventrobasal (ventral posterior medial nucleus) thalamus

VGluT2 : vesicular glutamate transporter 2

VPM : noyau médial postérieur ventral du thalamus

VZ/SVZ : zones ventriculaire et sous-ventriculaire

Table des illustrations

Figure 1. La microglie aux multiples visages 31

Figure 2. Colonisation du SNC en formation par la microglie 35

Figure 3. Les principales fonctions microgliales pendant le développement du SNC..... 49

Figure 4. Représentation schématique du système somatosensoriel des vibrisses 64

Figure 6. Conservation de l'organisation spatiale des vibrisses à chaque relai cérébral..... 65

Figure 5. La voie lemniscale canonique relayant l'information sensorielle du thalamus au cortex somatosensoriel primaire 65

Figure 7. Les synapses thalamocorticales excitatrices et inhibitrices au sein d'un tonneau 66

Figure 8. Les différentes morphologies dendritiques des neurones excitateurs de la couche 4 du cortex somatosensoriel 67

Figure 9. Interneurones en « panier » des tonneaux 70

Figure 10. Profil développemental des propriétés et de la plasticité synaptique à la synapse thalamocorticale de la couche 4 du cortex en champ de tonneaux 76

Figure 11. Les neurones transitoires de la sous-plaque participent à la maturation de la connectivité thalamocorticale inhibitrice 80

Figure 12. Profil développemental de l'inhibition GABAergique dans la couche 4 du cortex en champs de tonneaux 82

Figure 13. L'absence de la signalisation neurone-microglie fractalkine/CX3CR1 retarde le recrutement de la microglie au sein des tonneaux, causant un retard maturation fonctionnelle de la synapse thalamocorticale excitatrice 86

Figure I.1. Early microglia depletion using liposome-encapsulated clodronate 100

Figure I.2. Microglia depletion impairs the functional maturation of monosynaptic excitatory and disynaptic feedforward inhibitory thalamocortical pathways 101

Figure I.3. BDNF deficiency in microglia impairs the functional maturation of thalamocortical excitatory and feedforward inhibitory pathways onto layer 4 principal neurons 103

Figure I.4. Long term effects of early microglia manipulations 105

Supplementary figure I.S.1. Development of thalamocortical feedforward inhibition onto layer 4 principal neurons of the barrel cortex 111

Supplementary figure I.S.2. Evolution of the AMPA/NMDA ratio at thalamocortical synapses during physiological development 112

Figure II.1. Maternal immune activation and *in utero* microglia depletion do not affect the density of parvalbumin interneurons but decrease the synaptic strength between parvalbumin interneurons and principal cells in the input layer of the barrel cortex of adult mice 126

Figure II.2. Maternal immune activation and *in utero* microglia depletion alter the density of PV interneurons and enhance synaptic strength at FS-PC synapses in the input layer of the barrel cortex of juvenile mice 128

Figure II.3. Maternal immune activation and *in utero* microglia depletion enhance inter-barrel inhibition in the cortex of juvenile mice 129

Figure II.4. Maternal immune activation and *in utero* microglia depletion retard lateral spread of sensory information *in vivo* 131

Supplementary figure II.S.1. *In utero* microglia depletion and maternal immune activation do not affect barrels formation in the primary somatosensory cortex 134

Supplementary figure II.S.2. *In utero* microglia depletion and maternal immune activation impair the laminar positioning of PV interneurons in young animal but not in the adults 135

Figure III.1. Ratio NMDA/AMPA en fonction de l'âge chez les souris $BDNF^{+/+}$, $BDNF^{+/-}$ et $BDNF^{-/-}$ 140

Figure III.2. Le défaut de maturation fonctionnelle de la synapse thalamocorticale excitatrice résultant de l'absence de BDNF microglial est retrouvé chez les souris n'ayant qu'un allèle BDNF fonctionnel dans leurs cellules microgliales 140

Figure III.3. L'absence de BDNF microglial entraine des modifications de la plasticité à court terme à la synapse thalamocorticale sur les interneurones FS 143

Figure III.4. La MIA et la déplétion microgliale *in utero* semblent affecter les propriétés présynaptiques des synapses inhibitrices entre FS et PC des tonneaux 149

Figure III.5. Effets de la MIA et de la déplétion microgliale *in utero* sur l'inhibition *feedforward* disynaptique des cellules principales de la couche 4 à P20 152

Avant-propos

Notre système nerveux central (SNC) est constitué de neurones et de cellules gliales, deux grandes populations cellulaires dont la différence fondamentale repose sur leur excitabilité électrique. Les neurones sont capables de répondre à une stimulation externe par la génération d'un potentiel d'action pouvant se propager à travers le réseau de neurones (même si certains neurones ne génèrent pas de potentiels d'action). Les cellules de la glie ne sont pas équipées pour générer de vrais potentiels d'action capables de se propager dans un réseau, bien qu'elles expriment des canaux dont l'ouverture dépend du potentiel membranaire. Au cours des dernières décennies, cette glie qui historiquement était considérée comme une simple « colle à neurones » inerte, s'est finalement révélée être impliquée de façon active dans de nombreuses fonctions cérébrales essentielles. Du point de vue quantitatif, les cellules gliales sont assez nombreuses et on a longtemps cru que, plus on montait dans l'échelle de l'évolution, plus elles surpassaient les neurones en nombre. Durant un demi-siècle il fut estimé que le cerveau humain – qui renferme environ 10^{11} neurones comprenant plusieurs centaines de types différents –, contenait 10^{12} cellules gliales, soit un rapport glie:neurones de 10:1. Après de long débats, symptomatiques de la difficulté à quantifier précisément le nombre de cellules dans l'ensemble du SNC, ce dogme a récemment été remis en cause par une nouvelle méthode de comptage, le fractionnement isotrope, qui a révélé un rapport glie:neurones inférieur à 1:1, dénombrant moins de 100 milliards de cellules gliales dans le cerveau humain (von Bartheld *et al.*, 2016). Tout de même presque aussi nombreuses que les neurones, les cellules gliales se divisent en trois principales populations aux caractéristiques et fonctions très distinctes : les astrocytes, les oligodendrocytes et cellules NG2, et la microglie.

Initialement décrite au début du siècle dernier par Pio del Rio Hortega, la microglie (ou cellules microgliales) constitue la population des macrophages résidents dans le SNC et représente 10 à 15% du nombre total des cellules gliales (Verkhratsky and Butt, 2007). Son appellation découle d'un caractère morphologique qui, dans le tissu adulte, la différencie des deux autres types gliaux : un corps cellulaire de petite dimension mais muni de longs prolongements ramifiés. Ces dernières années, une multitude de nouveaux outils de pointe et d'animaux transgéniques ont permis d'élargir notre compréhension de la microglie. Cette vague de découvertes a alimenté un intérêt croissant pour le rôle que ces cellules jouent dans diverses neuropathologies mais aussi en conditions physiologique et notamment au cours du développement du SNC.

Mon introduction, visant à présenter l'ensemble des éléments nécessaires à la compréhension des résultats obtenus et à la discussion, est en grande partie basée sur la publication "*Microglial cells : Shaping the brain for the future*" (Mosser *et al.*, 2017), présentée en annexe de la thèse.

Je commencerai par résumer nos connaissances actuelles relatives à la microglie et ses divers états d'activation, puis j'évoquerai les dernières preuves expérimentales qui ont modifié notre vision du comportement de ces cellules immunitaires dans le SNC adulte en conditions physiologiques.

La deuxième partie sera consacrée à l'origine des cellules microgliales, qui fût longtemps débattue, et à la façon dont les microglies envahissent et acquièrent leur maturité dans le SNC en développement.

Au cours des troisième et quatrième parties, nous verrons comment les microglies interagissent avec d'autres cellules cérébrales en développement et contrôlent l'architecture des réseaux neuronaux et synaptiques.

Je discuterai dans une cinquième partie comment, au vu de leurs fonctions développementales décrites précédemment, les microglies pourraient contribuer au déclenchement et/ou à la progression de pathologies neurodéveloppementales.

Enfin, je détaillerai le développement du cortex somatosensoriel en champ de tonneau, choisi comme modèle pour explorer l'influence de la microglie sur la maturation des réseaux synaptiques ; et la façon dont la microglie colonise et influence le développement postnatal de cette structure corticale.

Chapitre 1

Introduction

I. La microglie dans tous ses états

Comme les macrophages périvasculaires et méningés, mais contrairement aux macrophages du plexus choroïde, les cellules microgliales dérivent de précurseurs hématopoïétiques au cours du développement embryonnaire et établissent des populations stables (Goldmann *et al.*, 2016). En adéquation avec leur identité de cellules immunitaires, les cellules microgliales sont la première ligne de défense rapide en cas de pathologie du SNC et, à ce titre, représentent un outil de diagnostic pour le neuropathologiste. Cette mobilisation conduit à des changements de leur phénotype, appelé classiquement « activation microgliale », permettant à la microglie de réagir et de s'adapter de manière spécifique au nouvel environnement (Hanisch and Kettenmann, 2007 ; Ransohoff and Perry, 2009 ; Shemer *et al.*, 2015).

1. Le large spectre d'« activation » microgliale

Dans le SNC adulte, l'activation des cellules microgliales a d'abord été décrite comme un changement morphologique : d'un petit soma d'où partent de longs et minces prolongements très ramifiés en conditions physiologiques, elles adoptent une morphologie peu ramifiée, leurs prolongements se rétractant et s'épaississant lors d'une perturbation homéostasique, ce qui peut par la suite conduire à une morphologie amiboïde, sans ramifications, dans les cas les plus graves (**Fig. 1A**). Nous savons maintenant que ces changements morphologiques s'accompagnent d'importantes modifications fonctionnelles, y compris de modifications de l'expression génique et des propriétés de motilité, d'une prolifération et d'une activité phagocytaire accrues, et de la libération de nombreux médiateurs pro- et anti-inflammatoires (Hanisch and Kettenmann, 2007 ; Kierdorf and Prinz, 2013 ; Ransohoff and Perry, 2009). Pourtant, l'activation microgliale n'est pas un phénomène obéissant à la loi du « tout ou rien » ; elle est au contraire progressive et totalement dépendante du contexte pathologique. Il est donc incorrect de parler d'un seul état d'activation, sachant qu'il existe en fait une grande diversité de phénotypes déterminés par une étroite détection des indices environnementaux et qui permet aux cellules microgliales de se comporter de façon spécifique en fonction des différentes modalités pathologiques (**Fig. 1A**) (Hanisch and Kettenmann, 2007 ; Kierdorf and Prinz, 2013 ; Ransohoff and Perry, 2009).

Les termes « activation » ou « états activés » sont donc trompeurs dans le sens où ils laissent entendre que, quelles que soient les conditions pathologiques, les cellules microgliales acquièrent systématiquement le même phénotype (dénommé « état activé/activation), ce qui n'est en fait nullement le cas. A l'instar du modèle de polarisation à deux états M1 et M2 des

macrophages présents dans les tissus non neuronaux (c'est-à-dire les macrophages périphériques), plusieurs auteurs ont adopté une classification M1 (pro-inflammatoire et neurotoxique) / M2 (anti-inflammatoire et neuroprotectrice) de la microglie réactive (Boche *et al.*, 2013). Toutefois, les plus récentes observations indiquent que ce modèle simplifié à deux états ne peut décrire la diversité réelle des états « réactifs » de la microglie (Heppner *et al.*, 2015 ; Martinez and Gordon, 2014 ; Prinz and Priller, 2014 ; Ransohoff, 2016). Cette notion de polarisation M1/M2 est aujourd'hui sérieusement remise en cause également pour les macrophages périphériques (Ginhoux *et al.*, 2016 ; Murray *et al.*, 2014), car elle ne rend pas compte de l'existence d'un continuum d'états fonctionnels. Même si les mécanismes qui sous-tendent les changements phénotypiques de la microglie ne sont pas entièrement éclaircis, on connaît plusieurs voies de signalisation qui modulent l'expression de ce phénomène.

2. La signalisation « *on* » / « *off* »

On a notamment tenté de classer les signaux neuronaux comme des voies de signalisation « *off* » ou « *on* » en fonction de leur mode d'action : les signaux « *off* » sont exprimés de manière constitutive afin de maintenir la microglie dans un état non réactif et donc de neutraliser l'activité pro-inflammatoire ; les signaux « *on* » sont inductibles et constituent des signaux d'alerte (Biber *et al.*, 2007). De ce fait, la suppression des signaux « *off* » et l'apparition de signaux « *on* » favorisent l'activation de la microglie. Ces deux catégories de signaux peuvent cependant contrôler aussi bien les fonctions « bénéfiques » que les fonctions « néfastes » de la microglie. De nombreuses voies de signalisation peuvent déterminent les changements de phénotype des cellules microgliales (Hanisch and Kettenmann, 2007 ; Kettenmann *et al.*, 2011 ; Kierdorf and Prinz, 2013 ; Ransohoff and Perry, 2009). Les cellules microgliales expriment en effet un large répertoire de récepteurs les rendant capable de détecter l'apparition soudaine de facteurs, de micro-organismes, de concentrations anormales de molécules… et permettant ainsi un dialogue constant entre les cellules microgliales et leur environnement.

Ce répertoire comprend des récepteurs aux neurotransmetteurs purinergiques (ionotropiques P2X et métabotropiques P2Y), glutamatergiques (ionotropiques et métabotropiques) et peut-être d'autres neurotransmetteurs comme le GABA, l'acétylcholine et la dopamine, mais ces derniers ont été uniquement étudiés dans les microglies en culture, et leur importance physiologiques n'a pas été déterminée. Ces récepteurs leur permettent de détecter l'activité neuronale locale. De nombreux récepteurs Toll-like (TLR) leurs permettent de reconnaître des

molécules pathogènes exogènes ou des ligands endogènes libérés en cas de lésion ou de stress métabolique, ce qui permet d'initier les réponses immunitaires adaptées. L'expression de récepteurs aux immunoglobulines et aux éléments du système du complément, ainsi qu'à diverses cytokines a également été observée dans divers contextes. Les cytokines regroupent une multitude de protéines de signalisation, incluant les interleukines, les interférons, les CSF, les TNF, les TGF et les chimiokines. Dans l'ensemble, un vaste éventail de signaux peut induire une multitude fonctions microgliales, ce qui rend une revue exhaustive impossible ici. Néanmoins, nous discuterons brièvement dans le paragraphe suivant le cas de la fractalkine, un des signaux « *off* » le mieux documenté chez l'adulte, et ayant également plusieurs rôles connus pendant le développement (Arnoux and Audinat, 2015).

3. La voie de signalisation fractalkine/CX3CR1

La chimiokine fractalkine (ou CX3CL1) est exprimée uniquement par les neurones et son seul récepteur connu, CX3CR1, est exclusivement exprimé par la microglie dans le parenchyme du SNC (Cardona *et al.*, 2008). Un large ensemble de données indique que la voie de signalisation CX3CL1/R1 inhibe l'activation de la microglie. Dans plusieurs modèles animaux de neuropathologies, tels que les accidents vasculaires cérébraux, la sclérose latérale amyotrophique, ou les maladies de Parkinson et d'Alzheimer, un déficit en CX3CL1 ou CX3CR1 entraîne une production accrue de médiateurs pro-inflammatoires, dont l'interleukine-1β (IL-1β), et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui provoquent la mort cellulaire (Cardona *et al.*, 2006 ; Cho *et al.*, 2011 ; Morganti *et al.*, 2012 ; Sheridan and Murphy, 2013). Il convient toutefois de noter que bon nombre de ces études étaient fondées sur l'utilisation de souris ayant subi une invalidation génique (knockout ou KO) constitutive pour la fractalkine ou pour son récepteur, en supposant que cette déficience n'aurait aucune influence sur les conditions physiologiques. Nous savons maintenant que la signalisation fractalkine influence le développement normal du SNC (Arnoux and Audinat, 2015 ; Paolicelli *et al.*, 2014) et que les souris adultes CX3CR1 KO ont des déficits au niveau de plusieurs fonctions physiologiques du cerveau (Rogers *et al.*, 2011 ; Zhan *et al.*, 2014). Il serait donc important de réexaminer le rôle de cette voie de signalisation dans les conditions pathologiques à la lumière de ce que nous comprenons maintenant du rôle de la fractalkine et de la microglie au cours du développement. Le cas de la fractalkine illustre bien que l'activation d'une voie de signalisation donnée dans les cellules microgliales peut avoir une variété de résultats selon l'environnement, y compris les stades de développement.

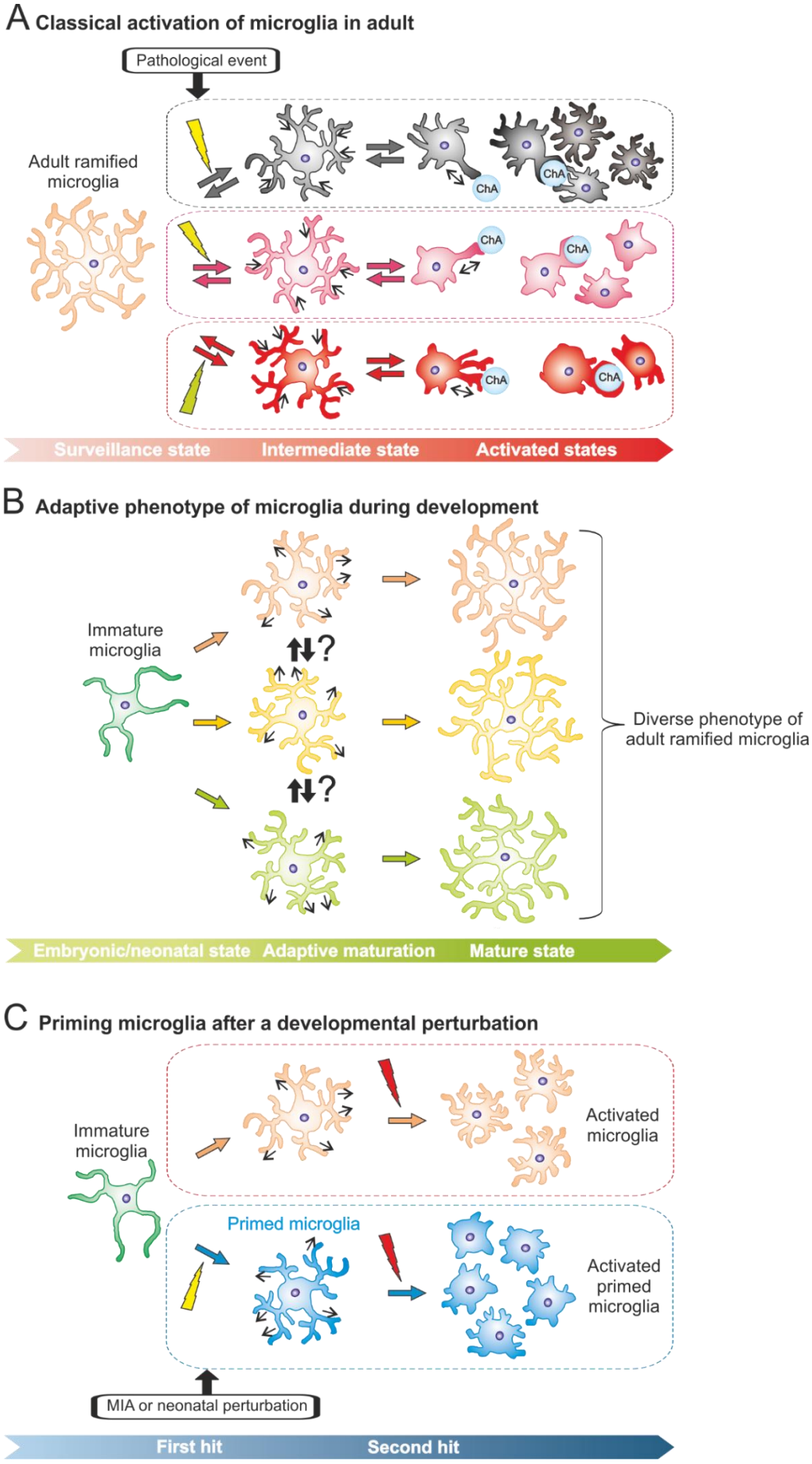

A Classical activation of microglia in adult
Pathological event
Adult ramified microglia
ChA
Surveillance state
Intermediate state
Activated states
B Adaptive phenotype of microglia during development
Immature microglia
?
Diverse phenotype of adult ramified microglia
Embryonic/neonatal state
Adaptive maturation
Mature state
C Priming microglia after a developmental perturbation
Immature microglia
Activated microglia
Primed microglia
Activated primed microglia
MIA or neonatal perturbation
First hit
Second hit

Figure 1. La microglie aux multiples visages. **(A)** "Activation" de la microglie dans le cerveau adulte. En conditions physiologiques, les cellules microgliales se présentent sous forme très ramifiée et scannent continuellement le parenchyme neuronal grâce à leurs prolongements mobiles. En cas de perturbation homéostasique, les cellules microgliales peuvent acquérir une panoplie différents phénotypes qui dépendront de la nature du stimulus et peuvent se traduire par des changements morphologiques (augmentation de la taille du soma et rétraction des prolongements), un remodelage du transcriptome et du protéome, une motilité cellulaire ou des prolongements vers un site de lésion, une prolifération, de la phagocytose ou encore la sécrétion de facteurs comme des cytokines, des facteurs de croissance ou des ROS. **(B)** Les phénotypes microgliaux au cours du développement embryonnaire et postnatal physiologique. La maturation microgliale suit pendant le développement un schéma général, depuis la cellule amiboïde immature ou très peu ramifiée à la cellule microgliale « de surveillance » entièrement ramifiée. Cependant, des indices exprimés de façon spatio-temporelle différente peuvent orienter les cellules microgliales vers différents phénotypes, ce qui conduit à et explique la diversité observée chez l'adulte. **(C)** Une perturbation embryonnaire ou néonatale (première atteinte, symbolisée sous forme d'éclair) peut « amorcer » la microglie, c'est-à-dire entraîner des modifications durables du phénotype microglial. Ce nouveau phénotype peut ne pas avoir de conséquences fonctionnelles, jusqu'à l'apparition d'une deuxième perturbation. Le phénotype acquis par la microglie après la deuxième atteinte est déterminé par la survenue de la première. ChA : source de chimioattractant

4. Surveillance constante et dynamique du SNC adulte

Au cours de cette dernière décennie, le développement de nouveaux outils d'analyse fonctionnelle et de nouveaux modèles animaux a complètement changé notre vision des fonctions de la microglie dans les conditions physiologiques. En 2005, deux publications pionnières ont révélé, en employant la microscopie *in vivo* à deux photons sur des souris CX3CR1-eGFP anesthésiées, que les cellules microgliales en conditions physiologiques sont loin d'être quiescentes comme on le supposait auparavant, mais au contraire étendent et rétractent leurs ramifications en permanence (Davalos *et al.*, 2005 ; Nimmerjahn *et al.*, 2005). Cette activité de « patrouille » des prolongements microgliaux est un moyen de détecter plus rapidement les signaux de danger se manifestant dans le parenchyme cérébral. Ces deux articles ont montré qu'en réponse à des lésions au laser ou à des applications locales d'ATP, qui est considéré comme un signal d'alarme (Rodrigues *et al.*, 2015), les cellules microgliales étendent rapidement leurs prolongements vers la lésion ou la source de l'ATP, qui agit ici comme un chimioattractant (**Fig. 1A**). Bien que d'autres voies de signalisation puissent contrôler la motilité orientée des processus de la microglie, les récepteurs P2Y12 purinergiques et les récepteurs A2A de l'adénosine jouent un rôle déterminant dans l'extension et la rétraction rapides du processus, respectivement, qui se produisent juste après une agression du parenchyme nerveux parenchyme (Haynes *et al.*, 2006 ; Orr *et al.*, 2009).

À la suite de ces premières observations, d'autres groupes ont montré qu'au cours de leur surveillance du parenchyme, les prolongements microgliaux entrent en contact avec les synapses. La fréquence et la durée de ces contacts sont régulées par l'activité du réseau neuronal et peuvent influencer le devenir et l'activité des synapses (Li *et al.*, 2012 ; Pfeiffer *et al.*, 2016 ; Sipe *et al.*, 2016 ; Tremblay *et al.*, 2010 ; Wake *et al.*, 2009). De façon intéressante, il a été montré que les cellules microgliales favorisent la formation de nouvelles épines dendritiques dans le cortex d'animaux effectuant une tâche d'apprentissage moteur (Parkhurst *et al.*, 2013). En parallèle, plusieurs groupes ont également découvert que la mobilisation de voies microgliales spécifiques pouvait conduire à la modulation de l'activité synaptique. C'est le cas par exemple de la fractalkine dont nous parlions dans la section précédente, qui régule la transmission synaptique excitatrice et la plasticité dans l'hippocampe (Rogers *et al.*, 2011 ; Scianni *et al.*, 2013) mais aussi de la signalisation microgliale *via* le TLR 4, qui contrôle indirectement la probabilité de libération de glutamate des fibres présynaptiques par la mobilisation d'astrocytes (Pascual *et al.*, 2012). Il a également été récemment démontré que les récepteurs P2Y12 microgliaux sont nécessaires à la plasticité synaptique pendant la période critique de dominance oculaire (Sipe *et al.*, 2016). Ces travaux déterminants ont fait naître l'idée que les cellules microgliales non seulement contrôlent, mais aussi régulent, les activités synaptiques et neuronales dans le cerveau sain (Schafer *et al.*, 2013 ; Tremblay *et al.*, 2011). Ces observations suggèrent en outre que des changements profonds dans le phénotype de la microglie lors de l'apparition de situations pathologiques auront deux conséquences : i) la perte de l'influence constitutive de la surveillance microgliale et ii) l'émergence de nouvelles interactions liées à la nature immunitaire de ces cellules. Toutefois, il existe une grande variété de circonstances dans lesquelles microglie « sentinelle » et microglie « activée » coexistent. Par exemple, on considère en général que l'activité phagocytaire est une caractéristique des macrophages activés, y compris des cellules microgliales. Pourtant, dans le gyrus denté de l'adulte, la microglie phagocyte les précurseurs neuronaux générés en conditions physiologiques, et cela se produit sans l'apparition d'aucun autre signe d'activation (Sierra *et al.*, 2010).

Cette constatation illustre l'extrême plasticité des cellules microgliales et rend difficile la prédiction de leur phénotype et de leur rôle dans un contexte donné juste d'après les connaissances que nous avons acquises sur d'autres modèles. De ce point de vue, l'étude des cellules microgliales au cours du développement du SNC représente un véritable défi puisque leur phénotype évolue constamment, passant de cellules presque amiboïdes lorsqu'elles

entrent dans le parenchyme du SNC au stade embryonnaire à des cellules entièrement ramifiées au stade juvénile. Il est frappant de constater qu'à un stade de développement donné, des cellules microgliales ayant des phénotypes morphologiques (et donc fonctionnels) différents sont réparties de façon différente dans des régions du SNC. Ceci reflète la dynamique de la colonisation du cerveau par les cellules microgliales et leur exceptionnelle capacité à s'adapter à leur environnement, ce qui explique le couplage étroit entre leur propre maturation et le développement des autres éléments du SNC. Cette diversité de phénotypes prédit une variété de fonctions dans le SNC en développement. Dans la partie suivante, nous nous pencherons sur la façon dont les microglies envahissent et acquièrent leur maturité dans le SNC en développement.

II. Origine et développement de la microglie

1. Des envahisseurs venus d'ailleurs

L'origine des cellules microgliales diffère de celle des autres types cellulaires du parenchyme cérébral, et l'identification précise de l'origine et du lignage cellulaire de ces envahisseurs du SNC fut source de débats durant de nombreuses années. Plus de cent cinquante ans se sont écoulés depuis les premiers témoignages qui firent état de la présence d'éléments phagocytaires mésodermiques au sein du SNC. En effet, entre la fin du XIXème et le début du XXème siècle, Franz Nissl, William Ford Robertson, Ramon Y Cajal et Pio del Rio-Hortega proposaient déjà une origine mésodermique de ces cellules (Ginhoux *et al.*, 2013) ; voir aussi les récentes traductions des articles de Pio del Rio-Hortega (Sierra *et al.*, 2016)). Les cellules microgliales furent décrites pour la première fois à la fin des années 1800 par Franz Nissl, qui les nomma tout d'abord « cellules bâtons » ("Stabchenzellen"), puis par William Ford Robertson qui les identifia comme « mésoglie », en opposition aux neurones et autres cellules de la « macroglie » dérivant du neurectoderme. Il faudra attendre 1913 pour que Santiago Ramon y Cajal renomme ces cellules comme les « troisième élément du système nerveux » afin de les différencier des neurones et de la « neuroglie » décrite par Virchow en 1858 « Die Cellularpathologie », et 1919 pour que son collègue Pio Del Rio Hortega affine ce concept en les nommant « microglie ». Del Rio Hortega, surnommé le « père de la microglie », suscita une polémique en établissant cette distinction nette entre ces véritables éléments mésodermiques et les oligodendrocytes, auparavant considérés comme des composants de la mésoglie, ce qui donna lieu à une série de recherches fructueuses en Europe jusqu'à la fin des années 40. Dans les années 1960, il fut admis qu'il s'agissait bien des cellules immunitaires

effectrices intrinsèques au SNC. Il s'ensuivit une longue période de controverse concernant l'origine de ces cellules et deux hypothèses furent discutées. La première, qui soutenait la thèse d'une origine neuroectodermique commune avec les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes, fût proposée sur la base d'expériences dans un système de culture ou de transplantation de cellules de moelle osseuse adulte (De Groot *et al.*, 1992 ; Fedoroff *et al.*). La seconde postulait que les cellules microgliales provenaient de cellules hématopoïétiques, les monocytes, qui sont les leucocytes sanguins circulants, précurseurs des macrophages des tissus périphériques (Kaur *et al.*, 1987 ; Ling, 1994). Cependant, les données les plus récentes, que nous examinerons dans les paragraphes suivants, ne soutiennent pas cette hypothèse d'une origine monocytaire et au contraire appuient maintenant l'idée que les cellules microgliales sont issues de macrophages primaires provenant du sac vitellin extra-embryonnaire, qui est le premier site d'hématopoïèse (**Fig. 2**). L'hématopoïèse primaire se produit dans le sac vitellin vers le jour embryonnaire (E) 7 chez la souris et contribue à la production d'érythrocytes et de macrophages (Bertrand *et al.*, 2005 ; Palis *et al.*, 1999). Elle décroît au cours du développement embryonnaire et est progressivement remplacée par l'hématopoïèse définitive qui a lieu dans l'aorte, les gonades et le mésonéphros (AGM) à E10,5 (Ginhoux *et al.*, 2013). Les progéniteurs issus de l'hématopoïèse définitive se développent de façon transitoire dans le foie fœtal, qui produit toutes les cellules hématopoïétiques après E11,5 au cours de la vie embryonnaire. Après la naissance, ces cellules seront produites par la moelle osseuse (Hoeffel and Ginhoux, 2015).

Les macrophages primaires naissent dans les îlots sanguins du sac vitellin et se propagent dans l'embryon par le flux sanguin une fois le système circulatoire établi, autour de E8 et E10. L'étude des embryons de souris Ncx-1-/-, dépourvus d'échangeurs Na+/Ca2+, a démontré que le système cardiovasculaire est indispensable à la migration des macrophages (Ginhoux *et al.*, 2010). En effet, les précurseurs des cellules microgliales ne se propagent pas dans ces embryons déficients en Ncx-1, dépourvus de battements cardiaques et d'une circulation sanguine fonctionnelle. L'absence d'échangeurs Na+/Ca2+ n'affecte toutefois pas l'hématopoïèse primaire qui a lieu dans le sac vitellin, les embryons Ncx-1-/- possédant un nombre similaire de macrophages comparé aux embryons témoins. Ainsi, les macrophages primaires colonisent différents tissus, comme le SNC en développement, et se différencient en macrophages fœtaux selon une voie non-monocytaire (Takahashi *et al.*, 1996).

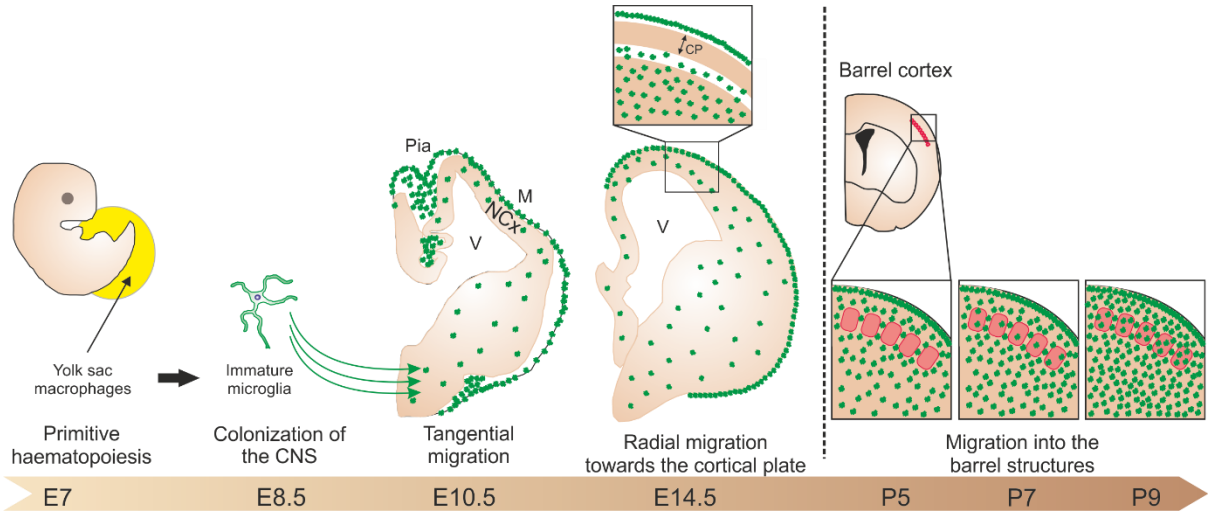


Figure 2. Colonisation du SNC en formation par la microglie. Les précurseurs microgliaux naissent dans le sac vitellin aux premiers stades embryonnaires, E7 chez la souris. Ils envahissent le SNC à partir de E8.5 et suivent ensuite des voies de migration tangentielle et radiale pour envahir toutes les régions du SNC. Par exemple, dans le champ de tonneaux du cortex somatosensoriel, les cellules microgliales migrent radialement pour infiltrer les différentes couches. Les tonneaux de la couche 4 contiennent les synapses thalamocorticales codant les informations sensorielles des vibrisses et se forment à P3. Les cellules microgliales n'entrent dans les tonneaux qu'après P5 pour interagir avec les synapses thalamocorticales et influencer leur maturation fonctionnelle. La distribution des cellules microgliales dans la couche 4 ne devient homogène qu'après le début de la deuxième semaine postnatale. CP : plaque corticale, M : méninges, NCx : néocortex, V : ventricule.

Les expériences de cartographie de la destinée cellulaire appuient également l'idée que les macrophages du sac vitellin sont à l'origine des cellules microgliales adultes. En effet, Samokhalov et ses collaborateurs ont développé une lignée de souris exprimant une recombinase Cre inductible sous le promoteur Runx1 (*Runt-related transcription factor 1*), un facteur de transcription impliqué dans le développement de toutes les lignées cellulaires hématopoïétiques (Samokhvalov *et al.*, 2007). En croisant ces souris avec les lignées ROSA26-stop-EYFP ou ROSA26-stop-LacZ, Ginhoux et ses collègues ont découvert que l'expression de Runx1 était limitée aux îlots sanguins du sac vitellin avant E8. L'induction de l'expression de la recombinase Cre à E7.5 marque 30% des macrophages du sac vitellin, pourcentage s'expliquant par l'efficacité partielle de la recombinaison, et qui permet de déterminer le devenir des macrophages nés dans le sac vitellin à cette période et de leur descendance. L'analyse de ces souris à différents jours embryonnaires indique qu'une proportion similaire de macrophages du sac vitellin et de cellules microgliales marqués est détectée à E10 et E13 (environ 30%). De plus, 30 % des cellules microgliales sont marquées chez les souris adultes lorsque la recombinase Cre est activée à E7,5. Cette proportion

identique de cellules recombinées chez les macrophages du sac vitellin présents dans le cerveau aux stades embryonnaires et chez la microglie adulte rend peu probable une invasion tardive du SNC par des cellules précurseurs non marquées qui se différencieraient en cellules de la microglie (Ginhoux *et al.*, 2010). Toutefois, une autre étude récente a suggéré l'existence d'une vague de monocytes fœtaux dérivés du foie qui infiltreraient le cerveau, atteignant un pic à P3, mais qui seraient rapidement éliminés par apoptose et ne contribuent pas à la population microgliale adulte (Askew *et al.*, 2017).

L'analyse des autres facteurs gouvernant la différenciation des cellules dérivant de l'hématopoïèse primitive et de l'hématopoïèse définitive étaye aussi la thèse selon laquelle l'origine de la microglie diffère de celle des autres macrophages. Le facteur de transcription Myb, par exemple, est superflu pour le développement des macrophages primaires mais est nécessaire pour celui des cellules souches hématopoïétiques issues de l'hématopoïèse définitive (Schulz *et al.*, 2012). En outre, Kierdorf et ses collaborateurs ont découvert que les cellules microgliales provenaient de cellules CD45- et c-kit-positives trouvées à E8 dans le sac vitellin, qui donnent naissance à des précurseurs de cellules microgliales exprimant CX3CR1, CD45 et F4/80 encerclant le tube neural à E9 (Kierdorf and Prinz, 2013). La survie et le développement des précurseurs microgliaux dépendent de l'expression du facteur de transcription Pu.1, également connu sous le nom de Sfpi (Kierdorf and Prinz, 2013) et sont régulés par le facteur de stimulation des colonies (CSF)-1R (Erblich *et al.*, 2011 ; Ginhoux *et al.*, 2010) ainsi que son ligand IL-34 (Greter *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2012). Le facteur de régulation de l'interféron (IRF) 8, un facteur nucléaire exprimé de façon constitutive dans les cellules microgliales, est également un déterminant transcriptionnel crucial du phénotype de ces cellules (Minten *et al.*, 2012). Les macrophages primaires du sac vitellin migrent dans tout l'embryon après l'établissement du système circulatoire. Ils sont détectables dans l'intégralité de l'embryon aux tous premiers stades du développement, mais ils ne persisteront que dans le SNC où ils se différencieront en cellules microgliales au cours d'un processus qui nécessite le TGF-β. Ce facteur de croissance détermine les signatures moléculaires et fonctionnelles de la microglie adulte chez l'humain et le rongeur, mais il est également nécessaire à la différenciation et au maintien de la microglie au cours du développement embryonnaire (Butovsky *et al.*, 2014). Il est intéressant de noter que le maintien des cellules microgliales à l'âge adulte est également contrôlé, grâce à un couplage entre prolifération et apoptose qui conditionne un turnover rapide, et cette régulation repose sur la signalisation CSF-1R (Askew *et al.*, 2017 ; Elmore *et al.*, 2014).

Dans le SNC embryonnaire humain, les premières cellules microgliales qui pénètrent dans le parenchyme cérébral empruntent trois voies : les méninges, le plexus choroïde et les ventricules (Verney *et al.*, 2010). Chez les rongeurs, la voie d'entrée ventriculaire implique la NADPH oxydase Nox2 microgliale, qui génère des ions superoxydes, régule la chimiotaxie microgliale dépendante de la voir CSF-1R/VEGFR1, et favorise l'infiltration des cellules microgliales dans la zone sous-ventriculaire du cortex (Lelli *et al.*, 2013). Ce rôle développemental de la signalisation NADPH oxydase Nox2 contraste avec sa fonction neurotoxique en conditions pathologiques (Chen *et al.*, 2016 ; Vilhardt, 2016). Une autre voie de signalisation favorisant le recrutement et le regroupement des cellules microgliales dans les niches germinales du cortex en développement – c'est-à-dire les zones ventriculaire et sous-ventriculaire (VZ/SVZ) – fait intervenir la production de chimiokines CXCL12 par des progéniteurs intermédiaires (cellules Trb2+), ce qui favorise le recrutement des cellules microgliales dans la SVZ (Arnò *et al.*, 2014).

2. Colonisation du parenchyme cérébral

Une fois dans le parenchyme nerveux, les cellules microgliales amiboïdes migrent suivant un schéma spatio-temporel spécifique à leur voie d'entrée et s'accumulent d'abord en amas, à proximité ou dans la matière blanche en développement, où elles prolifèrent activement (Verney *et al.*, 2010). Ces cellules poursuivent leur colonisation en deux phases (**Fig. 2**). La première phase consiste en une migration tangentielle pendant laquelle les cellules migrent le long de la surface pour se répartir en une nappe uniforme couvrant toutes les régions du SNC. Des études ont montré que ces précurseurs de microglie se déplacent le long des pieds de la glie radiaire et des faisceaux axonaux dans la rétine, le colliculus supérieur, le cortex et le cervelet (Cuadros and Navascués, 2001 ; Pont-Lezica *et al.*, 2011). Au cours de la seconde phase de migration, les cellules microgliales migrent perpendiculairement à la surface du SNC pour rejoindre toutes les couches du cerveau (**Fig. 2**). Pendant la formation du cortex, elles se propagent jusqu'à la plaque sous-corticale et s'accumulent à l'interface entre cette dernière et la plaque corticale (Monier *et al.*, 2007). Cette sous-plaque, dont l'existence est transitoire, contient des neurones matures recevant les afférences thalamiques qui traversent le cortex immature ((Allendoerfer and Shatz, 1994), et voir le paragraphe VI.4.2.2). Les cellules microgliales envahissent ensuite la plaque corticale en vue d'atteindre leur ultime destination. Aux premiers stades de développement, les cellules microgliales immatures se caractérisent par une morphologie typiquement amiboïde, avec très peu voire sans prolongements (**Fig. 1B**), ce qui facilite leur migration (Monier *et al.*, 2007 ; Rigato, 2011). Leur comportement

locomoteur est semblable à celui des fibroblastes en culture et consiste en une extension polarisée au niveau du front de migration, une translocation du noyau et une rétraction de l'arrière de la cellule (Marín-Teva *et al.*, 1998 ; Swinnen *et al.*, 2013). La migration des cellules microgliales serait facilitée par des interactions avec les molécules d'adhésion situées sur les vaisseaux sanguins et/ou avec les composants de la matrice extracellulaire, notamment via le récepteur à la fibronectine, l'intégrine α5β1 (Smolders *et al.*, 2017). Au cours du développement embryonnaire, la colonisation du SNC par la microglie coïncide avec sa vascularisation (E10 chez les rongeurs) et une étroite relation entre microglie et bourgeons vasculaires pourrait être impliquée dans la migration microgliale (Earle, 1998 ; Monier, 2006 ; Rigato, 2011). Cette association entre microglie et vaisseaux sanguins est également observée dans les couches corticales superficielles aux stades postnatals précoces (Arnoux *et al.*, 2013). Par ailleurs, la croissance des vaisseaux est stimulée par la libération de facteurs microgliaux solubles (Rymo, 2011). Par conséquent, les animaux présentant peu ou pas de microglie (par exemple, les souris Pu.1$^{-/-}$) présentent un réseau vasculaire sous-développé. Il est donc probable que la microglie et les vaisseaux sanguins influencent réciproquement leur développement, mais les mécanismes de signalisation impliqués dans ces interactions ne sont pas encore bien compris.

Dans la moelle épinière embryonnaire par exemple, des appositions très rapprochées entre microglie et glie radiaire ont été observées, ce qui suggère que cette dernière peut également guider la migration microgliale tangentielle (Rigato, 2011). De plus, l'expression microgliale des métalloprotéinases matricielles (MMPs) qui peuvent remodeler la matrice extracellulaire contribue à la régulation de la migration des microglies pendant l'embryogenèse. L'expression des MMP-8 et -9 notamment joue un rôle clé dans la propagation de la microglie et l'inhibition de la MMP entrave la propagation de la microglie (Kierdorf *et al.*, 2013).

Comme pour la migration des oligodendrocytes, la migration des cellules microgliales pourrait être guidée par un gradient de molécules de « guidage » comme les sémaphorines et les nétrines (Spassky *et al.*, 2002) mais aussi par des chimiokines telles que MCP1 et MIP-1alpha (Rezaie *et al.*, 2002), CXCL12 (Arnò *et al.*, 2014) ou des ligands de CSF-1R et VGEFR1 (Lelli *et al.*, 2013). Dans le SNC postnatal, d'autres facteurs neuronaux aident les cellules microgliales à atteindre leur cible définitive dans le parenchyme cérébral. C'est le cas de la chimiokine neuronale fractalkine, dont le récepteur, CX3CR1, est exprimé exclusivement au niveau des cellules microgliales (voir paragraphe I.3). Chez les souris déficientes en CX3CR1, le recrutement de cellules microgliales dans l'hippocampe et le

cortex somatosensoriel en formation au tout début du développement postnatal est retardé de plusieurs jours (Hoshiko *et al.*, 2012 ; Paolicelli *et al.*, 2011). Ces observations pourraient s'expliquer par l'effet chimio-attracteur de la fractalkine ou par une altération de la motilité microgliale chez les souris knockout (Arnoux and Audinat, 2015 ; Liang *et al.*, 2009). Enfin, bien que cela n'ait pas été étudié spécifiquement, les récepteurs microgliaux purinergiques P2X4 et P2Y12 pourraient également être impliqués dans la régulation de la mobilité cellulaire induite par les molécules chimio-attractrices au cours du développement (Haynes *et al.*, 2006 ; Ohsawa *et al.*, 2007).

Plusieurs études indiquent que certains des facteurs qui attirent la microglie au cours du développement proviennent de neurones apoptotiques. En effet, au cours des développements embryonnaire et postnatal, le SNC subit une vague de mort cellulaire massive connue sous le nom de mort cellulaire programmée (« *programmed cell death* » ou PCD), qui cible les neurones en prolifération et post-mitotiques, et qui est nécessaire à l'homéostasie tissulaire, à la morphogenèse et au bon développement des circuits (revue par (Yeo and Gautier, 2004). La PCD survient en conséquence de la surproduction de neurones pendant le développement et de leur compétition concernant la survie et les facteurs trophiques (Oppenheim, 1991). L'hypothèse selon laquelle les cellules microgliales seraient attirées par les cellules apoptotiques a tout d'abord été soutenue par la coïncidence chronologique entre la survenue de la PCD et l'entrée des microglies dans certaines zones du cerveau (Ashwell, 1990 ; Marín-Teva *et al.*, 1999 ; Perry *et al.*, 1985). On a effectivement découvert d'étroites associations entre cellules microgliales et neurones apoptotiques dans plusieurs régions cérébrales chez le rongeur, dont le néocortex (Upender and Naegele, 1999), le cervelet (Marín-Teva *et al.*, 2004), la rétine (Hume *et al.*, 1983 ; Moujahid *et al.*, 1996), l'hippocampe (Dalmau *et al.*, 1998 ; Wakselman *et al.*, 2008) et la moelle épinière (Rigato, 2011 ; Sedel *et al.*, 2004), ainsi que dans le télencéphale humain (Rakic and Zecevic, 2000). Il a été proposé que les neurones mourants sécrètent des signaux « *find-me* », connus pour attirer les macrophages périphériques, et qui pourraient potentiellement attirer les cellules microgliales pendant la PCD (**Fig. 3A**). C'est le cas de la fractalkine (Truman *et al.*, 2008), de la lysophosphatidylcholine lipidique (Lauber *et al.*, 2003), de la sphingosine 1 phosphate (Gude *et al.*, 2008) et des nucléotides ATP et UTP (Elliott *et al.*, 2009). Xu et ses collaborateurs ont récemment confirmé cette hypothèse en démontrant que la colonisation microgliale du tectum optique du poisson zèbre était induite par les neurones apoptotiques et la lysophosphatidylcholine (Xu *et al.*, 2016). Mais malgré toutes ces observations corroborant

un lien entre la PCD et la distribution des cellules microgliales dans le SNC en développement, il est clair que la répartition des cellules microgliales n'est pas entièrement déterminée par la distribution des cellules apoptotiques puisque des décalages entre les distributions de ces deux populations ont été rapportés (Ashwell, 1990). De plus, de récentes expériences réalisées chez des souris déficientes en protéine pro-apoptotique BAX, chez lesquelles la PCD est affectée, indiquent que la colonisation microgliale du SNC est indépendante de l'apoptose neuronale (Eyo *et al.*, 2015). La colonisation du parenchyme cérébral par ces cellules immunitaires repose sur un autre processus important, leur prolifération active (Alliot *et al.*, 1991 ; Dalmau *et al.*, 2003). Cette activité de prolifération de la microglie amiboïde a été constatée au cours du développement embryonnaire dans plusieurs structures, dont la moelle épinière (Rigato, 2011), le corps calleux (Imamoto and Leblond, 1978), la rétine (Marín-Teva *et al.*, 1999), l'hippocampe et le cortex (Dalmau *et al.*, 2003). Cette prolifération est régulée par plusieurs molécules de signalisation, dont GM-CSF, CSF-1, NT-3, IL-4 et IL-5 (pour revue (Navascues *et al.*, 2000). Dans les VZ/SVZ embryonnaires, la mort cellulaire stimule la prolifération microgliale par le biais d'un mécanisme dépendant de la cytokine MIF (facteur d'inhibition de la migration des macrophages, (Arnò *et al.*, 2014). La prolifération microgliale se poursuit au cours du développement postnatal précoce (Arnoux *et al.*, 2013 ; Dalmau *et al.*, 2003) puis décroît progressivement ; elle est presque négligeable durant la deuxième semaine postnatale chez les rongeurs, ce qui concorde avec le très faible niveau de prolifération des cellules microgliales adultes (Marín-Teva *et al.*, 1999).

Une fois les phases de prolifération et migration achevées, les cellules microgliales amiboïdes ayant atteint leur emplacement définitif se différencient peu à peu en cellules ramifiées. On ne connaît pas encore très bien les mécanismes régissant leur transition vers un phénotype mature, mais des études en culture ont mis en évidence l'importance des astrocytes dans la maturation morphologique et fonctionnelle des microglies. Les cellules microgliales cultivées sur une monocouche d'astrocytes développent des prolongements après 5 à 7 jours, dont l'élongation et le branchement continueront encore quelques jours pour former un territoire bien délimité autour du soma (Sievers *et al.*, 1994). On peut également constater la formation de ramifications lors de l'exposition à milieu conditionné par les astrocytes, en l'absence de contacts directs entre astrocytes et microglie ; et l'on sait que les purines (ATP et adénosine) et les cytokines (TGF-β, M-CSF et GM-CSF) interviennent dans l'induction de ce phénotype (Schilling *et al.*, 2001 ; Sievers *et al.*, 1994 ; Wollmer *et al.*, 2001). Les changements

morphologiques subits par la microglie en développement s'accompagnent d'une évolution de ses propriétés électrophysiologiques. Les cellules amiboïdes immatures se distinguent par l'expression de conductances potassiques (K+) entrantes tandis que les cellules en maturation au cours du développement postnatal expriment peu de canaux K+ à conductance entrante et quelques canaux K+ sous-tendant des courants transitoires sortants ; et les cellules microgliales adultes ne présentent quant à elles pratiquement aucun canaux voltage-dépendants (Arnoux *et al.*, 2013 ; Avignone *et al.*, 2008 ; Boucsein *et al.*, 2000 ; Brockhaus *et al.*, 1993 ; Menteyne *et al.*, 2009 ; Rigato *et al.*, 2012). Dans les cellules en culture, ces changements fonctionnels dépendent de facteurs astrocytaires diffusibles (Schmidtmayer *et al.*, 1994), incluant le TGF-β qui contrôle la surexpression de canaux potassiques à conductance sortante (Schilling *et al.*, 2001). Dernièrement, l'analyse transcriptomique a permis d'identifier le TGF-β comme un régulateur majeur de l'acquisition du phénotype moléculaire et fonctionnel des cellules microgliales matures chez l'humain et le rongeur (Butovsky *et al.*, 2014). Ces travaux ont montré que le profil d'expression génique de la microglie mature est acquis après le jour postnatal (P) 4, possiblement un peu avant P21, ce qui a été récemment confirmé (Matcovitch-Natan *et al.*, 2016). A P4, le profil transcriptionnel des cellules microgliales diffère du profil d'expression des autres cellules myéloïdes, y compris des macrophages recrutés dans le cerveau en conditions pathologiques, des lignées de cellules microgliales classiquement utilisées (BV2 et N9) et des cellules microgliales en culture. Ces résultats confirment la complexité de l'extrapolation des observations faites sur la microglie dans les modèles simplifiés, comme la culture cellulaire, à des situations *in situ*. De plus, les cellules microgliales chez l'adulte présentent divers profils transcriptomiques et propriétés fonctionnelles selon la région du SNC dans laquelle elles résident (Grabert *et al.*, 2016 ; Hart *et al.*, 2012 ; Schnell *et al.*, 1999). Bien que cela n'ait pas encore été analysé aux premiers stades du développement postnatal, il est très probable que les interactions réciproques entre la microglie et d'autres cellules du cerveau au cours du développement entraînent une certaine hétérogénéité au niveau des phénotypes microgliaux (**Fig. 1B**). Cette hétérogénéité est à prendre en compte dans les études concernant le développement de ces cellules immunitaires, hautement plastiques et adaptatives. En outre, de récents travaux révèlent que le séquençage transcriptomique conventionnel basé sur le tri cellulaire est considérablement contaminé par des artefacts générés par la dissociation des tissus, et suggèrent donc d'utiliser la méthode de RiboTag pour isoler les ARNm associés aux ribosomes. Couplée à la technologie Cre/lox, cette approche permet d'isoler directement les ARNm associées aux ribosomes d'un type cellulaire donné (donné par la spécificité de la Cre)

en évitant les étapes d'isolation et de purification des cellules. Le séquençage des ARNm détermine le translatome du type cellulaire, révélant donc de façon fiable les protéines qui seront exprimées par les cellules microgliales à un temps donné (Haimon *et al.*, 2018 ; Kang *et al.*, 2017).

Pour conclure cette partie, il semble désormais assez clair que les cellules microgliales du SNC adulte sain sont toutes dérivées de précurseurs embryonnaires générés lors de l'hématopoïèse primaire et non de monocytes circulants dérivés de précurseurs de la moelle osseuse. Il convient toutefois de souligner qu'une contribution de précurseurs embryonnaires provenant d'une autre source que le sac vitellin ne peut être totalement exclue. La colonisation du SNC et la différenciation des cellules microgliales sont régulées par un vaste répertoire de voies de signalisation impliquant des interactions avec d'autres cellules du SNC, et paraissent intimement liées à la maturation des réseaux neuronaux. Il est intéressant de mentionner que dans le télencéphale de rongeur, la répartition des cellules microgliales reste hétérogène jusqu'à la fin de la première semaine postnatale (Arnoux *et al.*, 2013) et que leur densité atteint un pic au cours de la deuxième semaine postnatale avant de diminuer et de se stabiliser aux niveaux adultes seulement à la fin du premier mois postnatal (Nikodemova *et al.*, 2015 ; Paolicelli *et al.*, 2011). Les mécanismes responsables de cette baisse de la densité des microglies restent à identifier, mais il est intéressant de constater que la réduction de densité microgliale à 4 semaines postnatales coïncide avec l'émergence de leur profil transcriptomique adulte et l'établissement de leur morphologie ramifiée (Matcovitch-Natan *et al.*, 2016). Finalement, rappelons que la grande majorité des études sur la colonisation du SNC par la microglie reposent sur des analyses de la distribution microgliale à des moments précis du développement, et non sur des études d'imagerie en temps réel qui permettraient de mieux comprendre la dynamique de cette colonisation (voir par exemple (Smolders *et al.*, 2017 ; Swinnen *et al.*, 2013).

III. Contrôle microglial de la mort et de la survie développementale des neurones

1. Nettoyage et induction de l'apoptose développementale

En raison de l'identité immunitaire des cellules microgliales, ainsi que de leur rôle notoire de phagocytes professionnels en contexte pathologique, de nombreuses études se sont penchées sur leur implication dans la PCD survenant au cours du développement, évoquée dans le paragraphe précédent. La PCD intervient aussi dans le cadre de la neurogenèse continue chez

l'adulte, et la microglie est également impliquée dans l'élimination des corps cellulaires issus de cette neurogenèse (Fourgeaud *et al.*, 2016).

Comme mentionné précédemment, plusieurs signaux « *find-me* » libérés par les neurones apoptotiques sont susceptibles de contribuer au recrutement des cellules microgliales dans certaines régions au cours des développements embryonnaire et postnatal précoce (**Fig. 3A**). Une fois parvenus à la source des signaux « *find-me* », les macrophages sont alors stimulés par des signaux « *eat-me* », qui sont généralement des ligands présents au niveau de la membrane des cellules apoptotiques. Le signal « *eat-me* » le mieux conservé du point de vue évolutif est la phosphatidylsérine (PS), habituellement retenue dans le feuillet interne de la bicouche membranaire, et exposée au niveau du feuillet externe dans les cellules apoptotiques (Shklover *et al.*, 2015). D'autres signaux « *eat-me* » attirants la microglie ont été découverts (voir (Sierra *et al.*, 2013), en font partie des éléments du système du complément (**Fig. 3B**) ainsi que la thrombospondine. Par ailleurs, l'UDP – résultant de l'hydrolyse de l'UTP – peut se lier aux récepteurs microgliaux P2Y6 et stimuler la phagocytose (Koizumi *et al.*, 2007). La capacité de la microglie à phagocyter les cellules apoptotiques au cours du développement est en général importante, mais spécifique à la région, son efficacité oscillant entre 18 et 100% au pic de la PCD dans différentes régions du cerveau (Ashwell, 1990 ; Caldero *et al.*, 2009 ; Dalmau *et al.*, 2003 ; Marín-Teva *et al.*, 2004 ; Wakselman *et al.*, 2008).

D'autres types cellulaires, notamment de la lignée des astrocytes, contribuent à la phagocytose des cellules apoptotiques (Sierra *et al.*, 2013). L'analyse du lien entre apoptose et phagocytose au cours du développement de la drosophile a permis de suggérer que la fonction phagocytaire des phagocytes professionnels est établie indépendamment et en amont de la PCD, ce qui peut expliquer l'élimination très rapide et efficace des cellules apoptotiques (Shklyar *et al.*, 2014). Il se peut aussi que la PCD soit stimulée par les cellules phagocytaires. En effet, les cellules microgliales ne sont pas uniquement des éboueurs, mais aussi d'actifs exterminateurs de neurones. Diverses études ont montré qu'au cours du développement, elles libèrent des médiateurs qui induisent la mort cellulaire (**Fig. 3**). Par exemple, le facteur de croissance des nerfs (NGF) relargué par la microglie déclenche la mort cellulaire aux premiers stades du développement dans la rétine d'embryon de poulet, et ce avant même que ne débute la synaptogénèse (Frade and Barde, 1998). La microglie participe également à l'apoptose des motoneurones de la moelle épinière. Les expériences réalisées sur des cultures d'explants isolés à partir d'embryons de rat à E12 et E13 ont montré que le facteur de nécrose tumorale (TNFα) dérivé des macrophages entraîne la mort des motoneurones avant le début de la PCD.

Cette période du développement embryonnaire E12-13 coïncide avec l'invasion du parenchyme par les cellules microgliales (Rigato, 2011), et il a été montré que le TNFα microglial et son récepteur motoneuronal TNFR1 sont spécifiquement exprimés entre E12 et E13, c'est-à-dire deux jours avant la PCD, la mise en place de cette voie de signalisation transitoire permet donc d'induire la PCD des motoneurones à E15 (Sedel *et al.*, 2004). Dans le cervelet, les cellules de Purkinje sont soumises à la PCD aux stades postnatals précoces, comme le révèle la méthode TUNEL et le marquage immunohistochimique de la caspase-3 à P3 (Marín-Teva *et al.*, 2004). À ce stade développemental, les cellules microgliales exhibent une morphologie amiboïde et on peut observer dans leur soma des inclusions immuno-positives pour la calbindine, un marqueur spécifique des cellules de Purkinje, ce qui laisse supposer que les cellules microgliales ont phagocyté ces dernières. En outre, éliminer la microglie de tranches cérébelleuses en culture inhibe drastiquement l'apoptose des cellules de Purkinje (Marín-Teva *et al.*, 2004). Les auteurs de ces travaux ont montré que le stress oxydatif microglial jouait un rôle essentiel dans ce processus, la microglie relâchant des anions superoxydes qui induisent soit directement la PCD, soit par l'intermédiaire d'une dismutation spontanée en peroxyde d'hydrogène, aussi connu pour activer l'apoptose. Les ions superoxyde produits par la microglie sont également impliqués dans l'apoptose développementale des neurones hippocampiques (Wakselman *et al.*, 2008). Chez les rongeurs, pendant les deux premiers jours de vie, les prolongements microgliaux entrent en contact avec la plupart des cellules apoptotiques identifiées par la caspase-3 activée, et l'absence de l'intégrine microgliale CD11b ou de l'immuno-récepteur DAP12 provoque une réduction de l'apoptose neuronale et de la production d'ions superoxyde. Ces données privilégient donc le concept selon lequel les cellules microgliales induisent l'apoptose des neurones qu'elles phagocytent, suivant un schéma semblable à celui de la mort cellulaire provoquée par "l'engloutissement" (« *engulfment-promoted* ») décrit précédemment chez *C. elegans* (Hoeppner *et al.*, 2001 ; Reddien *et al.*, 2001). Mais les cellules microgliales peuvent aussi phagocyter des précurseurs neuronaux viables sans induire leur apoptose (Cunningham *et al.*, 2013), comme il l'a été observé dans les zones en prolifération du prosencéphale de rat et de singe, où la microglie phagocyte activement des précurseurs neuronaux n'exprimant aucun marqueur apoptotique au cours des derniers stades de la neurogenèse corticale, ce qui serait nécessaire pour réguler de l'épaisseur du néocortex. De façon intéressante, désactiver la microglie *in utero* avec des tétracyclines ou l'éliminer au moyen de liposomes contenant du clodronate dans le cortex cérébral fœtal entraîne une hausse du nombre de précurseurs neuraux dans la SVZ, ce qui serait dû à un défaut de phagocytose et affecterait la

cytoarchitecture cérébrale, tandis que l'activation microgliale induite par inflammation prénatale (activation immunitaire maternelle ou MIA) conduit à une diminution de leur nombre (Cunningham *et al.*, 2013). La MIA sert de modèle pour explorer les effets d'une infection maternelle prénatale sur le développement du cerveau du fœtus, et peut-être induite par injection de lipopolysaccharide bactérien pour mimer une infection bactérienne ou de polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)) servant à mimer une infection virale. Le LPS active les TLR4, le poly(I:C) les TLR3. Ces observations qui suggèrent que la microglie restreint considérablement le nombre de précurseurs neuronaux pendant le développement embryonnaire normal sont en quelque sorte en contradiction avec d'autres rapports, selon lesquels elle favoriserait au contraire la production de précurseurs neuronaux dans la SVZ, vraisemblablement par la libération de différentes cytokines (voir paragraphe II.2 et (Arnò *et al.*, 2014 ; Shigemoto-Mogami *et al.*, 2014). Les causes de cette divergence restent floues mais sont probablement symptomatiques de l'utilisation d'outils différents pour éliminer les cellules microgliales ou pour manipuler leur phénotype : utilisation de mutant déficient en CSF1R dans un cas, liposomes contenant des clodronates dans un autre, ou encore « inactivation » par la minocycline, une tétracycline antibiotique connue pour inhiber l'activation microgliale chez les adultes (Möller *et al.*, 2016). Néanmoins, ces études montrent clairement que les conditions qui affectent le nombre ou le phénotype des cellules microgliales pendant les stades périnatals influencent également le nombre de précurseurs neuronaux.

En conclusion, les cellules microgliales interviennent sur différents aspects de la mort cellulaire développementale : en tant que phagocytes professionnels, elles éliminent les cellules mourantes ou mortes, et il est également établi à présent qu'elles sont capables d'induire la mort des neurones, soit en déclenchant l'apoptose via la libération de médiateurs, soit en phagocytant directement les précurseurs neuronaux viables. Les voies de signalisation impliquées dans la phagocytose microgliale des cellules apoptotiques au cours du développement ont fait l'objet de nombreuses études (Shklover *et al.*, 2015). Cependant, les mécanismes responsables de la phagocytose microgliale des cellules non apoptotiques, ou phagoptose, au cours du développement restent peu connus (Brown and Neher, 2014).

2. Soutenir la survie et la prolifération des neurones en développement

Pendant le développement du SNC, les neurones ont besoin d'un soutien trophique pour survivre et être correctement intégrés dans les circuits neuronaux. En plus de son rôle

d'élimination et de nettoyage pendant le développement, il a été mis en évidence que les cellules microgliales soutiennent la survie et la prolifération des neurones.

Dans les cultures primaires de neurones embryonnaires mésencéphaliques et corticaux, un milieu conditionné par la microglie permet d'accroître la fixation des neurotransmetteurs ainsi le nombre de neurones matures. Cela suggère que les cellules microgliales ont un effet neurotrophique, qui s'exerce par libération de facteurs diffusibles, probablement dérivés du plasminogène (Nagata *et al.*, 1993). La microglie purifiée à partir du cerveau embryonnaire de rat promeut la croissance des neurites de neurones en culture en relarguant une protéine de la matrice extracellulaire, la thrombospondine (Chamak *et al.*, 1994). De façon intéressante, la thrombospondine, que l'on retrouve jusqu'à la deuxième semaine postnatale dans la microglie (Chamak *et al.*, 1995), est aussi fortement exprimée par les astrocytes et favorise la synaptogénèse (Christopherson *et al.*, 2005). Le milieu conditionné à partir de cultures de cellules microgliales amplifie également la prolifération des cellules granulaires du cervelet en culture grâce aux cascades de signalisation de delta-Notch, des MAP kinases et de la voie phosphatidylinositol-3-kinase/Akt (Morgan *et al.*, 2004). De façon similaire, la prolifération des précurseurs neuronaux diminue dans les cultures préparées à partir d'embryons de souris déficients en facteur de transcription Pu.1, et donc dépourvus de microglie. Il est intéressant de noter que la genèse d'astrocytes est également amoindrie dans les cultures issues de souris Pu.1 KO et que tant l'astrogenèse que la prolifération de précurseurs neuronaux sont restaurées par l'ajout de cellules microgliales naïves aux cultures (Antony *et al.*, 2011). Plus récemment, Ueno et ses collègues ont fourni des preuves manifestes d'une action trophique de la microglie sur le développement des neurones in vivo (Ueno *et al.*, 2013). En se basant sur les différentes stratégies suivantes : l'inhibition de l'activation microgliale induite par la minocycline, la déplétion génétique transitoire des cellules microgliales (souris Cd11b-DTR), et l'utilisation de souris CX3CR1 KO, ils ont montré que les cellules microgliales activées situées dans la substance blanche sous-corticale, sur la trajectoire des axones des cellules pyramidales de la couche 5, favorisent la survie de ces neurones corticaux aux premiers stades postnatals (**Fig. 3D**). Bien que l'interprétation des expériences basée sur l'utilisation de minocycline soit discutable, en particulier à ces stades de développement (Arnoux *et al.*, 2014), cette étude a également apporté des éléments tangibles *in vitro* et *in vivo* pour dire que cette action trophique de la microglie est due à la libération du facteur de croissance de l'insuline 1 (IGF-1). Comme mentionné précédemment, les cellules microgliales amiboïdes situées dans la SVZ aux mêmes stades postnatals précoces supportent la neurogenèse, et

l'oligogenèse également (Arnò *et al.*, 2014 ; Shigemoto-Mogami *et al.*, 2014). Toutefois, ces actions n'implique pas l'IGF-1, mais dépendent de la production d'IL-1β, d'IL-6, du TNFα et de l'IFNγ (Shigemoto-Mogami *et al.*, 2014). L'ensemble de ces constatations démontre que les cellules microgliales régulent le nombre de neurones produits et maintenus dans le SNC en développement en agissant sur la prolifération, la survie et la mort des progéniteurs et précurseurs neuronaux. Nous ne connaissons pas encore clairement l'importance quantitative de ces processus dans l'établissement du nombre final de neurones qui seront par la suite intégrés dans les réseaux fonctionnels. Les expériences les plus récentes visant à éliminer les cellules microgliales au cours du développement embryonnaire ont signalé des modifications importantes mais néanmoins quantitativement limitées de la densité et de la distribution des neurones corticaux après la naissance (Squarzoni *et al.*, 2014). Il reste à déterminer si ces effets modestes traduisent une influence minime de la microglie dans la régulation du nombre définitif de neurones ou bien la survenue de mécanismes compensatoires pour pallier aux effets engendrés par la déplétion microgliale. Il convient de mentionner également que les cellules microgliales régulent le devenir des neuroblastes dans les niches neurogéniques adultes (Ekdahl, 2012 ; Ribeiro Xavier *et al.*, 2015 ; Sierra *et al.*, 2010).

IV. Régulation microgliale du développement des réseaux synaptiques

En dehors du SNC, les macrophages périphériques sont importants pour l'organogenèse (Pollard, 2009), il n'est donc pas surprenant que les cellules microgliales contribuent à la régulation de la mort et de la survie des neurones pendant la mise en place du SNC. Le fait que les cellules microgliales contribuent aussi à la construction de réseaux synaptiques et plus particulièrement à leur affinement dépendant de l'activité est plus inédit, et repose sur la capacité exceptionnelle de ces cellules immunitaires à s'adapter à leur environnement. Etant donné que de nombreuses maladies neurodéveloppementales, notamment les pathologies des TSA (troubles du spectre autistique), se manifestent par des anomalies synaptiques structurelles et fonctionnelles, il est essentiel de comprendre les fonctions microgliales dans la formation du SNC ; et cela a déclenché une considérable vague de projets visant à élucider les rôles physiologiques précis de la microglie en interaction avec les réseaux neuronaux en développement.

1. Assemblage des circuits neuronaux

Le fonctionnement du néocortex repose sur la formation de réseaux neuronaux complexes qui commencent à se former au cours de l'embryogenèse, et repose sur des processus de

migration cellulaire et navigation axonale. L'élongation des axones dépend d'indices extracellulaires, disposés comme une autoroute moléculaire le long des voies de migration par des cellules « guides », dont la microglie fait partie comme il l'a récemment été montré (Pont-Lezica *et al.* ; Squarzoni *et al.*, 2014). Comme nous l'avons précédemment décrit, les cellules microgliales du SNC embryonnaire de diverses espèces, dont l'Homme, sont dispersées de façon spécifique et hétérogène (Ashwell, 1989 ; Cuadros *et al.* ; Dalmau *et al.* ; Herbomel *et al.* ; Hoshiko *et al.* ; Rigato ; Schlegelmilch *et al.* ; Squarzoni *et al.* ; Swinnen *et al.* ; Verney *et al.*).

Une étude récente a montré que de fortes densités de cellules microgliales se concentraient au niveau de certaines voies axonales en développement, suggérant un rôle dans la formation des circuits neuronaux (Squarzoni *et al.*, 2014). Les auteurs ont observé que c'était en effet le cas pour les axones dopaminergiques, dont la croissance est altérée à la fois par la déplétion génétique ou pharmacologique des cellules microgliales, mais aussi par la perturbation de voies de signalisation neurone-microglie et l'inflammation prénatale. Dans ce cas précis, la MIA et l'élimination de la microglie embryonnaire ont des effets opposés. La déplétion microgliale induit une extension dorsale des axones dopaminergiques exacerbée, alors que la MIA restreint cette extension dorsale mais entraine une exubérance prononcée de l'innervation dopaminergique au niveau ventral. Les observations en microscopies confocale et électronique ont révélé l'existence de contacts directs entre prolongements microgliaux et axones dopaminergiques, ainsi que la présence de fragments d'axones dopaminergiques dans le cytoplasme des cellules microgliales à E14.5 (Squarzoni *et al.* 2014). Cette dernière donnée indiquerait que les cellules microgliales contrôlent l'extension axonale via leur activité phagocytaire, mais il faudrait pouvoir quantifier le volume d'axones dopaminergiques absorbé par la microglie pour confirmer une telle hypothèse. Étonnamment, les axones sérotoninergiques voisins ne sont ni contactés ni affectés par la microglie, indiquant que le contrôle microglial de la croissance axonale dans cette région du cerveau est spécifique des fibres dopaminergiques (Squarzoni *et al.*, 2014). Les cellules microgliales interagissent pourtant avec d'autres faisceaux axonaux au cours de la formation du SNC, notamment dans conduisent à la défasciculation des axones dans le corps calleux dorsal (Pont-Lezica *et al.*, 2014). Cette défasciculation se produit dans les 3 modèles dans lesquels la phagocytose microgliale est déficiente (DAP12 mutant) ou accrue (MIA), ou quand les cellules microgliales sont absentes (Pu.1 knockout). Parallèlement, le profil transcriptionnel des cellules microgliales suggère que cet effet sur le développement du corps calleux résulte d'un

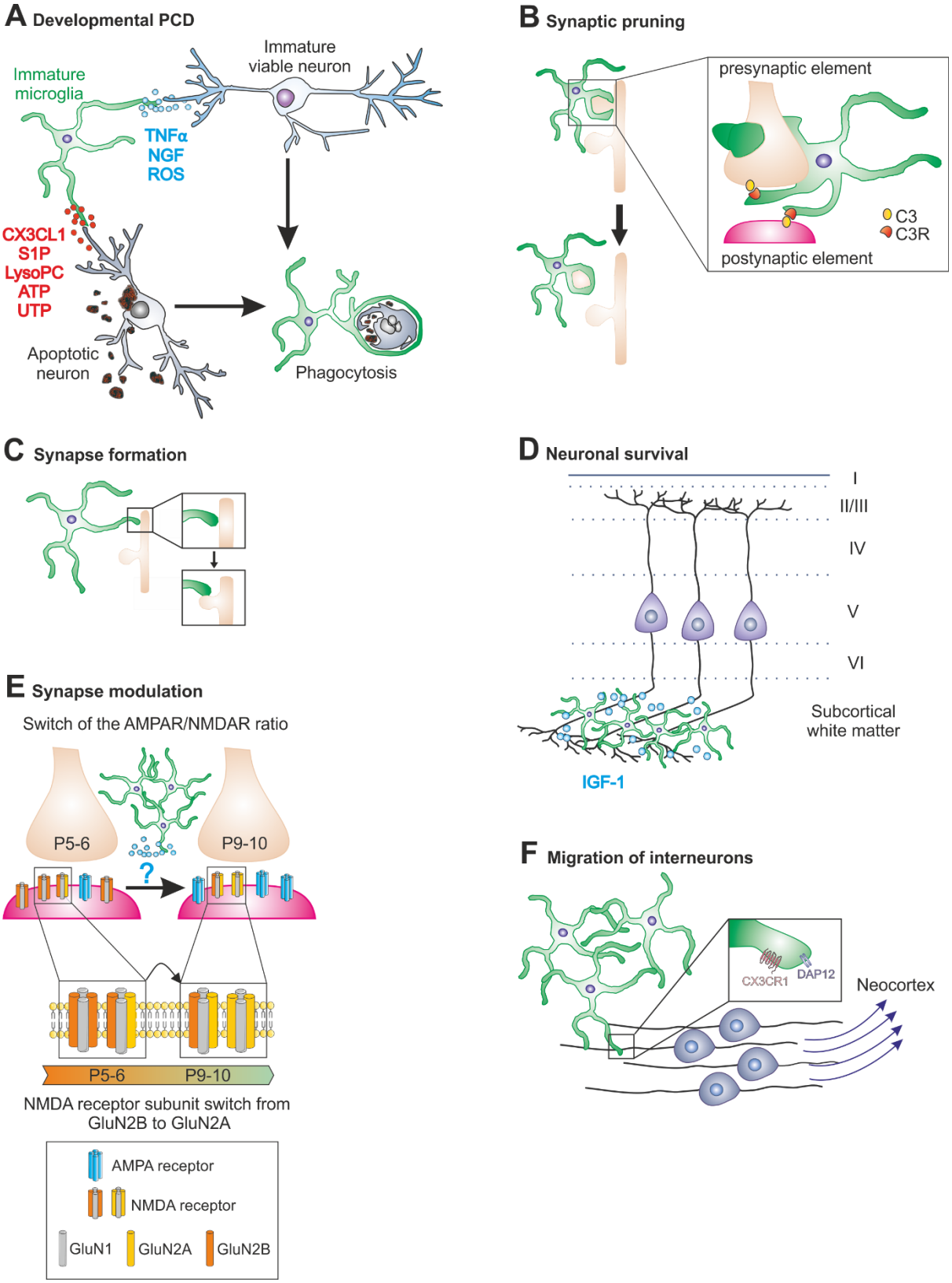


Figure 3. Les principales fonctions microgliales pendant le développement du SNC. (A) Phagocytose des neurones apoptotiques exprimant les signaux « mangez-moi » (en rouge) et induction de l'apoptose neuronale via différentes voies de signalisation. **(B)** Elagage des synapses inappropriées et surnuméraires marquées par les protéines de la cascade du complément. **(C)** Formation de nouvelles synapses induite par les signalisations BDNF ou IL-10. **(D)** Survie des neurones pyramidaux de la

couche 5 par le biais de la libération d'IGF-1 dans la substance blanche. **(E)** Régulation de l'expression fonctionnelle des récepteurs synaptiques AMPA et NMDA au niveau des synapses thalamocorticales du cortex du baril. **(F)** Régulation de la production et de la migration d'interneurones inhibiteurs corticaux, dépendant du récepteur CX3CR1 et de la molécule adaptatrice DAP12.

effet trophique plutôt que de l'activité phagocytaire (Pont-Lezica *et al.*, 2014). En manipulant l'activité microgliale comme il est détaillé ci-dessus, Squarzoni et al ont également mis en exergue une conséquence fonctionnelle sur la distribution laminaire des interneurones inhibiteurs néocorticaux (**Fig. 3F**). En effet, l'absence ou l'activation microgliale affecte la distribution des interneurones lhx6 de la plaque corticale, précurseurs des populations d'interneurones somatostatine (SST)- et parvalbumine (PV)-positifs, ce qui entraîne une hausse de la densité d'interneurones PV dans les couches corticales supérieures des souris à P20. La libération d'indices moléculaires microgliaux est donc probablement requise aussi pour la migration des précurseurs d'interneurones PV dans le prosencéphale (Squarzoni *et al.*, 2014). De façon remarquable, contrairement à ce qui se passe dans le cas du développement des axones dopaminergiques ou dans le contrôle du nombre de précurseurs neuronaux (voir les sections 3 et 4 ci-dessus), la déplétion microgliale et la MIA exercent les mêmes effets sur la distribution des interneurones. Cela suggèrerait que l'inflammation prénatale empêcherait les cellules microgliales d'exercer leurs rôles physiologiques. Un tel challenge immunitaire pendant le développement embryonnaire a très probablement de lourdes conséquences sur le développement et, par la suite, sur le fonctionnement des réseaux neuronaux de la descendance. Mais malgré l'abondance de preuves épidémiologiques associant MIA et troubles neuropsychiatriques, les conséquences fonctionnelles de la MIA sont très peu connues.

En parallèle de ces recherches s'intéressant à l'anatomie et à la morphologie du SNC en formation, des travaux ont montré que les perturbations prénatales de l'activité microgliale ont aussi un impact sur les fonctions synaptiques aux stades postnatals. En effet, manipuler l'activité microgliale embryonnaire par des approches génétique ou pharmacologique a pour conséquence d'altérer les propriétés des synapses glutamatergiques des collatérales de Schaffer sur les neurones pyramidaux de CA1 dans l'hippocampe de souris adulte (Roumier *et al.*, 2004 ; Roumier *et al.*, 2008). En outre, la signalisation impliquant la neurotrophine BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) BDNF et son récepteur TrKB semble impliquée dans ces interactions entre neurones et microglie, l'expression synaptique de TrKB étant drastiquement réduite chez les souris déficientes en DAP12 (Roumier *et al.*, 2004).

L’ensemble de ces études a dévoilé la contribution essentielle des cellules microgliales au développement embryonnaire physiologique du SNC, et a permis de montrer que la dysfonction microgliale à ces stades précoces du développement peut avoir des conséquences à long terme sur l’organisation et le fonctionnement corrects des réseaux synaptiques (voir paragraphe V). Les mécanismes par lesquels les cellules embryonnaires microgliales remplissent ces fonctions restent à identifier.

2. Élagage synaptique

Le remodelage des circuits neuronaux au cours du développement postnatal est essentiel au développement de l’architecture du SNC. L'excès de contacts synaptiques formés au cours du développement précoce doit être éliminé afin de ne conserver que les synapses appropriées et fonctionnelles, sélectionnées selon leur activité, qui pourront ensuite poursuivre leur maturation fonctionnelle (Hua and Smith, 2004).

Dans le SNC adulte, la capacité de la microglie à éliminer les synapses a d'abord été observée en conditions pathologiques, dans lesquelles les prolongements microgliaux dissocient les terminaisons synaptiques du corps cellulaire des motoneurones après une lésion du nerf facial (Blinzinger and Kreutzberg, 1968). Ce phénomène appelé "*synaptic stripping*" semble être initié par une réduction de l'activité synaptique (Yamada *et al.*, 2008). Mais les cellules microgliales adultes peuvent également éliminer les synapses par phagocytose, et ce processus peut aussi être régulé par l'activité (Sierra *et al.*, 2014 ; Šišková and Tremblay, 2013). Ces premiers constats, ainsi que les nouvelles découvertes *in vivo* révélant que les cellules microgliales interagissaient en permanence avec les synapses en conditions physiologiques (voir section I.4.), ont inspiré des travaux visant à tester le rôle de la microglie dans l'élimination des synapses surnuméraires au cours du développement. Grâce à l'utilisation des microscopies électronique quantitative en 3D et biphotonique *in vivo*, Tremblay et ses collègues ont démontré que la privation sensorielle (c.-à-d. l'adaptation à l’obscurité) pendant la période critique du développement du cortex visuel de jeunes souris augmentait la présence d'inclusions cellulaires et de structures phagocytaires dans les cellules microgliales du cortex visuel (Tremblay *et al.*, 2010). Ces travaux apportèrent la première preuve d'un rôle microglial du fameux "engloutissement" (« *engulfment* ») phagocytaire des synapses en conditions non pathologiques à des stades tardifs du développement postnatal. D’autres chercheurs ont alors rapporté que les cellules microgliales ingéraient également des éléments synaptiques dans l'hippocampe de souris au cours des premières semaines postnatales (Paolicelli *et al.*, 2011). Ils ont visualisé par microscopies électroniques et STED

des marqueurs de densité post-synaptique (PSD95) et de terminaisons pré-synaptiques (SNAP25) dans le cytoplasme des cellules microgliales, indiquant que la microglie phagocyterait des éléments pré- et post-synaptiques lors du développement de l'hippocampe. En outre, ils ont montré que l'élagage synaptique des épines dendritiques surnuméraires était retardé chez les souris sans CX3CR1, chez lesquelles le recrutement de la microglie est plus tardif. Autre fait intéressant, plusieurs propriétés fonctionnelles des synapses excitatrices ne se développent pas correctement chez les souris CX3CR1 KO (Hoshiko *et al.*, 2012 ; Paolicelli *et al.*, 2011 ; Zhan *et al.*, 2014). On pourrait penser que la persistance de ces propriétés synaptiques immatures est une conséquence du déficit d'élagage, mais elle peut aussi découler des nombreuses autres anomalies microgliales observées chez ces souris mutantes (Arnoux and Audinat, 2015 ; Arnoux *et al.* ; Pagani *et al.* ; Paolicelli *et al.* ; Rogers *et al.*). D'autant plus que de récentes découvertes du même groupe, ayant affiné leur étude grâce à de nouvelles techniques d'imageries, suggèrent que finalement, le rôle microglial dans l'élagage synaptique s'apparenterait plus à de la « trogocytose » (du latin *trogo* « grinoter »), c'est-à-dire une phagocytose partielle, qu'à de la phagocytose de synapses entières, et qu'aucun élément post-synaptique n'était « englouti » par les cellules microgliales (Weinhard *et al.*, 2018). En effet, l'imagerie microscopique à feuillet de lumière (LSFM) en temps réel de cultures organotypiques d'hippocampe ont révélé que la microglie ne phagocyte pas les épines dendritiques, et « trogocyte » les boutons présynaptiques. Leurs analyses de reconstruction en 3D basée sur des données de microscopie électronique CLEM (*correlative light and electron microscopy*) confirment ces données (Weinhard *et al.*, 2018).

D'autres données supportent un rôle microglial dans l'élimination synaptique dépendante de l'activité dans le système rétino-géniculé, un modèle classique de l'étude du remodelage synaptique (Shatz, 1990). Dans le corps géniculé latéral (CGL, situé dans la partie dorsale du thalamus) en développement, les projections des cellules ganglionnaires localisée dans les rétines des deux yeux se chevauchent pendant la première semaine postnatale, avant de se réorganiser pour occuper des territoires topographiquement distincts dans le CGL. Cette ségrégation spécifique de l'œil implique un élagage massif sélectif des connexions inappropriées, et on sait maintenant que cette élimination dépend de la voie classique du complément (Stevens *et al.*, 2007) et que les cellules microgliales contribuent à l'élagage sélectif des connexions à faible activité (Schafer *et al.*, 2012). Le pic de l'élimination synaptique survient à P5, âge auquel Schafer et ses collaborateurs ont observé la microglie phagocyter de ces éléments présynaptiques inappropriés des projections rétino-géniculées,

retrouvés ensuite dans le compartiment lysosomal des cellules microgliales. La microglie reconnaît les synapses à éliminer grâce à « l'étiquetage » de ces dernières par des molécules du système du complément. Dans le système immunitaire inné, les protéines du complément C1q et C3 servent de marqueurs facilitant l'élimination de matériel par les cellules phagocytaires (Stephan *et al.*, 2012). Un défaut d'expression du récepteur microglial CR3 ou de ses ligand neuronaux, C1q et C3, entraîne un déficit d'élagage synaptique, causant ensuite la perte de ségrégation des projections rétino-géniculées, comme il l'a été observé dans le cerveau adulte (Schafer *et al.*, 2012). Il est intéressant de noter que l'expression de C1q dans les axones rétino-géniculés à éliminer dépend du TGFβ libéré par les astrocytes (Bialas and Stevens, 2013). De façon surprenante, la trogocytose observée dans l'hippocampe ne dépend pas de l'expression de CR3 (Weinhard *et al.*, 2018).

D'autres voies de signalisation sont impliquées dans le remodelage des projections des cellules ganglionnaires de la rétine au cours du développement postnatal. La ségrégation œil-spécifique des projections rétino-géniculées dépend du niveau de sérotonine (5-HT) ; connue pour son action dans le contrôle de la formation des cartes sensorielles (van Kleef *et al.*, 2012). Un niveau de 5-HT trop élevé entraine une ségrégation incorrecte des fibres ipsi- et controlatérales (Upton *et al.*, 1999). Au cours du développement postnatal, les cellules microgliales expriment des récepteurs 5-HT2B, ce qui permet l'extension de leurs prolongements vers une source de sérotonine. Or les souris Htr2B$^{-/-}$, caractérisées par l'absence de récepteurs 5-HT2B, présentent des défauts dans l'élagage synaptique des projections rétiniennes ainsi que des altérations anatomiques au niveau des projections ipsilatérales (Kolodziejczak *et al.*, 2015). Cela suggère fortement que la signalisation 5-HT joue un rôle critique dans le recrutement microglial pour l'élimination les synapses indésirables. Cependant, d'autres types cellulaires expriment les récepteurs 5-HT2B dans le CGL, il faudrait donc mener d'autres d'expériences pour pouvoir confirmer que l'absence de récepteurs 5-HT2B dans les cellules microgliales est responsable du déficit observé chez les souris Htr2B$^{-/-}$. De plus, il a été montré que les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) régulent aussi le remodelage axonal, l'élimination synaptique et la plasticité synaptique dans le CGL (Lee *et al.*, 2014 ; Shatz, 2009). La microglie exprimant des protéines membranaires, telle DAP12, connues pour leur interaction avec les récepteurs du CMH I, il se pourrait qu'elle puisse identifier le CMH I exprimé à la surface des neurones comme marqueur conduisant à l'élimination synaptique. Pourtant,

l'implication de la microglie dans la modulation du CMH I des connexions rétino-géniculées au cours du développement n'a pas été spécifiquement étudiée.

D'autre part, le récepteur microglial transmembranaire TREM2, connu pour son rôle dans les maladies neurodégénératives (Colonna and Butovsky, 2017 ; Guerreiro *et al.*, 2013), a dernièrement été identifié comme étant un régulateur clé de la phagocytose synaptique dans l'hippocampe en développement (Filipello *et al.*, 2018). Les auteurs de ces travaux ont observé que l'absence de TREM2 se manifestait par une diminution du nombre de cellules microgliales dans l'hippocampe, associée à une morphologie plus ramifiée, observée chez les jeunes souris seulement ; ainsi qu'à une augmentation du nombre de synapses et de l'excitabilité synaptique pendant le développement postnatal. Une déficience en TREM2 mènerait donc à des anomalies de l'élagage synaptique, associée à des comportements sociaux altérés typiquement caractéristiques des troubles comportementaux observés dans les TSA. Les mutations de TREM2, en plus d'augmenter le risque de maladies neurodégénératives, pourraient donc causer le déclenchement de pathologies développementales.

Une voie de dégradation alternative à celle du protéasome, l'autophagie, a récemment été proposée comme mécanisme impliqué dans l'élagage synaptique par la microglie (Kim *et al.*, 2017). L'autophagie est un processus catabolique qui consiste à stocker une partie du cytoplasme, contenant organelles et macromolécules non fonctionnels, dans des vésicules à destination des lysosomes en vue d'une dégradation et d'un éventuel recyclage. Elle a dernièrement été identifiée comme impliquée dans la dégradation d'éléments extracellulaires, notamment des pathogènes et cellules mortes. Une perte constitutive d'autophagie dans les cellules microgliales est associée à un nombre accru d'épines dendritiques au niveau des neurones au cortex auditif primaire et somatosensoriel secondaire et des comportements sociaux et répétitifs anormaux (Kim *et al.*, 2017). Un nombre croissant d'observations rapportent une corrélation entre l'autophagie et la pathogenèse des TSA, ce qui soutient la découverte de ce groupe ; mais c'est à ce jour la seule étude ayant identifié une implication de l'autophagie dans l'élagage synaptique.

Enfin, de récentes observations ont mis en avant le rôle des astrocytes dans l'élagage synaptique développemental survenant dans le thalamus et la moelle épinière (Vainchtein *et al.*, 2018). Les astrocytes sécrètent l'IL-33 lors de la période postnatale de maturation synaptique, et cette interleukine se comporte comme un signal « trouvez-moi » (« *find me* ») et permet le recrutement de la microglie au niveau des synapses à éliminer.

3. Formation et maturation fonctionnelle des synapses

En plus de la phagocytose, il est maintenant clair que les cellules microgliales influencent les fonctions synaptiques par la libération de médiateurs spécifiques (Bechade *et al.*, 2013 ; Salter and Beggs, 2014). Cela a principalement été étudié en contexte pathologique chez l'adulte, mais nous savons maintenant que cela se produit également en conditions physiologiques (Eyo and Wu, 2013 ; Tremblay *et al.*, 2011). En outre, comme il est mentionné dans la section 4 ci-dessus, au cours du développement, les cellules microgliales contrôlent activement la mort et la survie des neurones par la libération de facteurs de croissance et de cytokines. Par conséquent, le relargage de médiateurs microgliaux contrôlant la maturation des circuits synaptiques pourrait constituer un aspect important des fonctions microgliales lors du développement. Cela pourrait expliquer par exemple comment elles induisent la formation de nouvelles épines sur les neurones corticaux en développement (Miyamoto *et al.*, 2016). L'imagerie biphotonique de la couche 2/3 du cortex somatosensoriel de souris éveillées a permis de montrer que les contacts établis entre les prolongements microgliaux et l'arborisation dendritique des neurones pyramidaux induisent la formation de filopodes. Cette production de filopodes ne survient qu'entre P8 et P10, un stade correspondant à une synaptogenèse intense dans les couches corticales supérieures, et l'élimination génétique des cellules microgliales entre P5 et P11 entraine une diminution de la densité d'épines dendritiques à P11. De façon intéressante, la microglie influence surtout la formation d'épines au niveau des synapses formées par les axones ascendants des neurones de la couche 4 (Miyamoto *et al.*, 2016). On ne connait pas les mécanismes sous-jacents à cette synaptogenèse corticale, mais ils reposent probablement sur la sécrétion d'un facteur microglial soluble, comme il l'a été observé lors d'expériences en culture, dans lesquelles la formation de nouvelles synapses était favorisée par l'interleukine 10 (IL-10) microgliale (Lim *et al.*, 2013). Les travaux précédents de l'équipe laissent également fortement supposer un rôle de cette libération de médiateurs microgliaux dans la maturation fonctionnelle des synapses thalamocorticales excitatrices dans le champ de tonneaux du cortex somatosensoriel primaire (Hoshiko *et al.*, 2012), mais nous détaillerons ces résultats par la suite (voir paragraphe V).

En outre, chez les souris adultes, comme chez les juvéniles de 3 semaines, l'élimination de la microglie affecte le renouvellement des épines dendritiques des neurones pyramidaux du cortex moteur (Parkhurst *et al.*, 2013). En effet, par le biais de la microscopie biphotonique trans-crânienne, Parkhurst et ses collègues ont mis en évidence l'action de la microglie dans la

génération ainsi que l'élimination de ces synapses. L'effet sur la production de nouvelles épines fut élégamment reproduit par la suppression sélective de BNDF microglial, dévoilant un rôle de ce facteur de croissance dans la formation de synapses (Parkhurst *et al.*, 2013). Plus récemment, l'imagerie en temps réelle sur tranches organotypiques d'hippocampe a également permis de montrer la contribution des cellules microgliales à la formation de filopodes. Le contact de la microglie induit la formation de filopodes à « tête d'épingle » (*spine head filopodia*), et il a été proposé que ce mécanisme contribue au mouvement des épines dendritiques vers de nouveaux boutons synaptiques, par exemple en réponse à un changement d'activité synaptique, participant donc à la plasticité (Weinhard *et al.*, 2018).

L'ensemble de ces observations suggère fortement qu'en plus de l'élagage synaptique, les cellules microgliales contribuent à la maturation des circuits synaptiques en exposant les neurones à des facteurs de signalisation qui régulent la maturation synaptique. L'identité de ces facteurs est encore largement inconnue mais parmi les nombreux candidats, trois suspects méritent une certaine attention. Le TNFα, connu pour sa capacité à influencer les fonctions synaptiques, pourrait par exemple être impliqué dans la maturation synaptique dépendante de la microglie au cours du développement postnatal. Cette cytokine est effectivement impliquée dans diverses fonctions neuronales comme la transmission ou la plasticité synaptique (Poon *et al.*, 2013). En particulier, le TNFα *in vitro* amplifie la transmission synaptique excitatrice en augmentant l'expression synaptique des récepteurs AMPA et NMDA (Beattie *et al.*, 2002 ; Stellwagen *et al.*, 2005). A l'inverse, il a récemment été démontré que le TNFα microglial induisait une diminution des courants synaptiques soutenus par les récepteurs AMPA dans les neurones épineux moyens du striatum après une administration chronique de cocaïne *in vivo* (Lewitus *et al.*, 2016). Le TNFα peut aussi moduler la transmission synaptique inhibitrice en favorisant l'endocytose des récepteurs $GABA_A$, diminuant ainsi leur expression fonctionnelle au niveau de la membrane synaptique (Stellwagen *et al.*, 2005). Il est également intéressant de mentionner la possibilité d'une coopération entre microglie et astrocytes pour augmenter considérablement multiplier la production et la sécrétion de TNFα (Bezzi *et al.*, 2001). Bien que jusqu'à présent, ce genre d'action conjointe de ces deux populations gliales n'ait été rapportée qu'en contexte pathologique (Bezzi *et al.*, 2001 ; Liddelow *et al.*, 2017), il serait intéressant d'examiner si le phénotype spécifique des cellules gliales au cours du développement favorise l'utilisation de mécanismes de signalisation qui, sans cela, ne sont observés qu'en pathologie. Le TNFα microglial libéré à proximité des synapses en maturation

pourrait donc éventuellement participer à la maturation fonctionnelle des circuits inhibiteurs et excitateurs.

Un autre médiateur, l'IL-1β, pourrait être impliquée dans ces mécanismes. Cette cytokine pro-inflammatoire peut être produite par plusieurs types cellulaires, dont la microglie. Son expression est considérablement plus élevée en conditions pathologiques, et l'IL-1β a déjà été identifiée comme étant capable de moduler la transmission synaptique excitatrice en diminuant l'expression et la phosphorylation des récepteurs AMPA (Kawasaki *et al.*, 2008 ; Lai and Todd, 2006 ; Tan *et al.*, 2014). De faibles niveaux basaux d'IL-1β en conditions physiologiques semblent nécessaires à l'apprentissage et à la mémoire (Hirsch *et al.*, 1996 ; Rachal Pugh *et al.*, 2001). De façon intéressante, l'activation de CX3CR1 par la fractalkine déclenche la libération d'IL-1β, ce qui aboutit à une augmentation de la probabilité de libération de neurotransmetteur, se traduisant par une facilitation de la transmission synaptique excitatrice dans la moelle épinière (Clark *et al.*, 2015). De surcroît, les déficits de plasticité synaptique dans l'hippocampe et les fonctions cognitives des souris CX3CR1 KO sont restaurées par en présence d'un antagoniste d'IL-1 (Rogers *et al.*, 2011), ce qui laisse supposer que ces déficits étaient la conséquence d'une surproduction d'IL-1β par la microglie chez les souris CX3CR1 KO. Il serait intéressant de vérifier si des niveaux physiologiques (et donc faibles) d'IL-1β produits par les cellules microgliales sont nécessaires pour une maturation synaptique normale. L'éventualité qu'un mécanisme similaire soit responsable de l'altération de la maturation synaptique pendant le développement postnatal des souris CX3CR1 KO (Hoshiko *et al.*, 2012 ; Paolicelli *et al.*, 2011 ; Squarzoni *et al.*, 2014) reste à explorer.

Un troisième facteur microglial exhibant une certaine propension à être potentiellement impliqué dans la maturation fonctionnelle des synapses est le BDNF, déjà évoqué précédemment. Nous en discuterons plus en détail en partie V, à la fin de cette introduction.

V. Conséquences au long terme des fonctions microgliales pendant le développement sur les neurones : la microglie est-elle le chaînon manquant dans les pathologies développementales ?

Les fonctions microgliales aux stades périnatals ont des conséquences à long terme sur la structure et l'activité des réseaux neuronaux. L'acquisition du dimorphisme sexuel dans certaines régions du cerveau est un bon exemple de ces effets à long terme du développement de la microglie.

La différenciation sexuelle du cerveau est un processus développemental reposant sur la modification des phénotypes physiologique et comportementaux pour correspondre au phénotype gonadique. Elle est initiée lors d'une période critique définie par l'apparition d'une sensibilité aux stéroïdes gonadiques. Les mécanismes cellulaires de la différenciation sexuelle sont divers et dépendent de la région du cerveau où ils se produisent, mais tous conduisent à orienter le développement du cerveau vers une masculinisation ou une féminisation. L'aire préoptique médiane (POA), aussi connue sous le nom de noyau sexuellement dimorphique, contient chez les rongeurs mâles adultes plus de neurones ayant une forte densité d'épines dendritiques et des astrocytes plus ramifiés que chez les femelles. Ces différences découlent de l'action de l'estradiol, produit par aromatisation de la testostérone, chez les souriceaux mâles pendant une période critique pour le dimorphisme sexuel dans la POA survenant entre P0 et P4 (McCarthy *et al.*, 2015 ; Schwarz and Bilbo, 2012). Les travaux de Margaret McCarthy et ses collègues ont notamment révélé l'importance des prostaglandines dans ces différences sexuelles. En effet, une exposition transitoire à l'estradiol pendant la période critique entraîne une augmentation de la production de prostaglandine E2 (PGE2) qui, à son tour, augmente le trafic des récepteurs AMPA et induit la formation et la stabilisation d'épines dendritiques (Amateau and McCarthy, 2004 ; Lenz *et al.*, 2011 ; Wright and McCarthy, 2009). Le doublement de la densité synaptique résultant chez les mâles est maintenu tout au long de leur vie, et est corrélé au comportement copulatoire masculin (Wright *et al.*, 2008). Observant qu'une seule injection de PGE2 chez les souriceaux femelles était suffisante pour induire la masculinisation de la densité des épines dendritiques et de la complexité astrocytaire dans le POA tout au long de la vie, les auteurs ont émis l'idée que les cellules microgliales seraient responsables du maintien sur le long terme des différences sexuelles acquises ou initiées pendant la période critique (McCarthy *et al.*, 2015). Ils ont découvert que les cellules microgliales de la POA chez les mâles étaient plus nombreuses, présentaient plus souvent des morphologies amiboïdes et produisaient plus de PGE2 que chez les femelles pendant la période critique. De plus, si on traite des femelles avec une dose masculine d'estradiol ou de PGE2, les cellules microgliales de la POA acquièrent une morphologie amiboïde et augmentent leur production de PGE2. De façon intéressante, ces effets de l'estradiol ou de la PGE2 chez les femelles sont inhibés par un traitement à la minocycline, qui inhibe également la masculinisation du comportement sexuel adulte induit par l'estradiol (Lenz *et al.*, 2013). L'ensemble de ces résultats indique donc que l'estradiol induit chez les mâles l'acquisition d'un phénotype microglial spécifique stimulant la production de PGE2 dans la POA, ce qui conduirait à la masculinisation du profil synaptique dans la POA et au

comportement sexuel des adultes. Le mécanisme par lequel les cellules microgliales influencent la connectivité synaptique de la POA est encore inconnu. Au-delà des effets de la minocycline qu'il convient d'interpréter avec prudence, en particulier à ces premiers stades postnatals (Arnoux *et al.*, 2013), l'identification de la voie de signalisation par laquelle les cellules microgliales façonnent le réseau synaptique dans la POA est nécessaire pour prouver définitivement leur rôle responsabilité. Récemment, Nelson et Lenz ont évalué l'impact d'une déplétion microgliale postnatale transitoire sur le développement comportemental des rats mâles et femelles, et ont détecté des anomalies de comportements sociaux, locomoteurs, et d'anxiété, quel que soit le sexe (Nelson and Lenz, 2017). De façon intéressante, l'élimination microgliale postnatale entraine une altération des taux de corticostérone en réponse à un stress chez les femelles adultes, mais pas chez les mâles. Les cellules microgliales semblent donc essentielles à la programmation précoce de ces comportements, et ce dimorphisme sexuel apporte une preuve supplémentaire de l'implication des cellules microgliales dans la différenciation sexuelle du cerveau.

Le rôle des cellules gliales dans le dimorphisme sexuel du cerveau s'est largement concentré sur l'étude de la POA, mais les différences sexuelles dans le phénotype ou les nombres de neurones, astrocytes et cellules microgliales a été reporté dans plusieurs régions du cerveau de plusieurs espèces, dont l'Homme (Schwarz and Bilbo, 2012). Bilbo et ses collaborateurs ont proposé l'idée intéressante que l'existence de différences sexuelles au sein des fonctions gliales pourrait fournir une base mécanistique pour les différences sexuelles bien établies dans la prévalence ou la gravité de nombreuses pathologies cérébrales, dont les maladies psychiatriques, associées aux troubles neurodéveloppementaux (Hanamsagar and Bilbo, 2016 ; Schwarz and Bilbo, 2012).

En effet, si les cellules microgliales contribuent activement à la formation et à la maturation fonctionnelle des réseaux en développement comme précédemment décrit, toute modification de leur phénotype au cours du développement peut avoir des conséquences à long terme sur la structure et la fonction de ces réseaux. La microglie est donc susceptible de contribuer à des maladies dues à une altération de développement neurobiologique, voire de les provoquer. Ce potentiel rôle des cellules microgliales n'est pas encore clairement établi, mais un nombre croissant d'études épidémiologiques, cliniques et précliniques indique une implication du système immunitaire. Les études épidémiologiques ont établi une forte corrélation entre les infections virales et bactériennes, c'est-à-dire la MIA, et le risque subséquent pour l'enfant de développer des pathologies comme la schizophrénie, les TSA, ou l'épilepsie (Knuesel *et al.*,

2014). La recherche fondamentale sur les modèles de rongeurs soutient cette association entre MIA et pathologies ; en effet, les infections virales et bactériennes le LPS pendant la grossesse induisent des changements structuraux et fonctionnels à long terme dans le cerveau de la progéniture, causés par la réponse immunitaire maternelle et non par le virus ou la bactérie eux-mêmes (Boksa, 2010 ; Knuesel *et al.*, 2014 ; Meyer, 2014 ; Meyer *et al.*). Une séquence d'évènements critiques liant l'activation du système immunitaire maternel aux altérations cérébrales des petits a été identifiée. Une augmentation du taux d'interleukine IL-6 dans le sérum maternel est nécessaire et suffisante pour modifier le développement du cerveau ainsi que le comportement des descendants (Smith *et al.*, 2007). Dans le cas des TSA, ce taux élevé d'IL-6 active les lymphocytes T helper 17 (Th17) du sang maternel qui sécrètent alors l'interleukine IL-17. L'IL-17 traverse ensuite le placenta, atteint le cerveau des embryons, ce qui induit une augmentation de l'expression des récepteurs à l'IL-17, favorisant ainsi la signalisation de l'IL-17 dans le cerveau (Choi *et al.*, 2016). La MIA implique également d'autres médiateurs inflammatoires tels que la chimiokine CXCL8 (Ellman *et al.*, 2010), le TNFα (Cai *et al.*, 2000 ; Xu *et al.*, 2006), l'IL-1β (Cai *et al.*, 2000 ; Rousset *et al.*, 2006) et l'IL-10 (Meyer *et al.*, 2008) ; et ses conséquences sur le développement du SNC résultent très probablement du déséquilibre de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (Knuesel *et al.*, 2014 ; Meyer *et al.*, 2009).

L'intégration des cellules microgliales à ce processus est de plus en plus étudiée. Dans un premier temps, des analyses post-mortem et par imagerie fonctionnelle TEP sur des patients souffrants de maladies liées aux troubles neurodéveloppementaux ont décelé des phénotypes microgliaux altérés (Frick *et al.*, 2013 ; Knuesel *et al.*, 2014 ; van Berckel *et al.*, 2008). En parallèle, le séquençage de l'ARN a révélé une association entre les TSA et l'expression des gènes liés à l'activation microgliales (Voineagu *et al.*, 2011). Dans plusieurs modèles animaux de MIA, le phénotype microglial est perturbé très tôt et certaines de ces altérations persistent à long terme, voire jusqu'à l'âge adulte (Cao *et al.*, 2015 ; Giovanoli *et al.*, 2013 ; Juckel, 2011 ; Krstic, 2012). Il faut toutefois mentionner que certaines données expérimentales contestent l'implication de la microglie comme intermédiaire entre MIA et altération du développement neurologique. Des études *in vivo* récentes ont notamment rapporté qu'aucun changement du phénotype de la microglie (densité, morphologie, expression de marqueurs) n'était observable après des injections de Poly(I:C) chez des souris gestantes (Giovanoli *et al.*, 2016 ; Smolders, 2015). L'analyse des souris transgéniques dont la microglie est altérée fournit également des éléments, mais aucune preuve définitive, de l'implication microgliales dans les troubles

neurodéveloppementaux. DAP12 est une protéine d'adaptation transmembranaire pour une famille d'immuno-récepteurs innés qui, dans le SNC sain, s'exprime de façon transitoire autour de la naissance et seulement dans la microglie (Roumier *et al.*, 2004). Les mutations de DAP12 chez l'homme induisent la maladie de Nasu-Hakola, entraînant une démence précoce sans altération neuronale apparente (Paloneva, 2000). Chez les souris déficientes en DAP12, la densité microgliale est transitoirement augmentée à P0, accompagnée d'un profil pro-inflammatoire marqué, et de modifications des synapses excitatrices de l'hippocampe adulte, présentant une augmentation de la contribution relative des récepteurs AMPA et une potentialisation à long terme (LTP) altérée (Roumier *et al.*, 2004). De façon intéressante, la MIA induite par injection de LPS chez des femelles WT entraîne un phénotype similaire chez des souriceaux (Roumier *et al.*, 2008). Chez les patients schizophrènes, le récepteur à la fractalkine CX3CR1 qui comme nous l'avons mentionné précédemment, n'est exprimé que par la microglie au niveau central, est sous-exprimé (Bergon, 2015). De plus, l'absence de CX3CR1 chez les souris adultes est associée à une dysfonction de la connectivité à longue distance, ainsi qu'à un comportement social altéré accompagné d'une recrudescence des comportements répétitifs (Zhan *et al.*, 2014). Cependant, on ne sait pas si ce phénotype, qui rappelle les troubles neurodéveloppementaux et neuropsychiatriques, est la conséquence de dysfonctionnements de la microglie au cours du développement (voir paragraphes IV.1-IV.3 et V) (Hoshiko *et al.*, 2012 ; Paolicelli *et al.*, 2011 ; Squarzoni *et al.*, 2014) ou de l'augmentation constitutive de la signalisation IL-1β responsable des déficits de mémoire et de la LTP altérée chez ces souris mutantes (Rogers *et al.*, 2011). En outre, il faut également souligner que les conséquences de l'absence de CX3CR1 sur la plasticité synaptique et la mémoire restent controversées, puisqu'un groupe a montré qu'elle favorisait la LTP (Maggi *et al.*, 2011). Une autre polémique concerne le rôle de la microglie dans le syndrome de Rett, un trouble neurodéveloppemental grave se manifestant par des phénotypes autistiques et résultant de mutations du gène *MeCP2* situé sur le chromosome X, impliqué dans la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes (Derecki *et al.*, 2012). La souris MeCP2 KO est utilisée comme modèle animal de la maladie, et initialement, il fut suggéré que les cellules microgliales jouaient un rôle majeur dans la pathogenèse du syndrome de Rett. En effet, la transplantation de cellules de la moelle osseuse de souris contrôles (possédant le gène *MeCP2*) chez des souris MeCP2 KO suffisait à bloquer la progression de la maladie et à améliorer les symptômes (Derecki *et al.*, 2012). Bien que le même groupe ait confirmé ces résultats (Cronk *et al.*, 2015), d'autres n'ont signalé presque aucun effet en réintroduisant des cellules myéloïdes WT dans trois différents modèles murins du syndrome de Rett (Wang *et*

al., 2015). Pourtant, il a récemment été montré que la microglie des souris MeCP2 KO élimine de façon excessive les synapses en phagocytant les terminaisons axonales présynaptiques aux stades avancés de la maladie. En revanche, il est surprenant d'observer que la perte d'expression comme la surexpression de *MeCP2* dans la microglie a peu d'effet sur cet élagage synaptique anormalement important (Schafer *et al.*, 2016). Ainsi, les mécanismes par lesquels la microglie contribue à ce syndrome ne sont pas clairs, et les dernières observations suggèrent que le rôle des macrophages résidents du SNC dans cette maladie n'est pas causal, n'étant effectivement pas impliquées dans les étapes initiales du développement du syndrome. Elles contribuent cependant certainement aux stades avancés de la maladie et la signalisation fractalkine/CX3CR1 contrôle sans doute certaines de leurs actions (Horiuchi, 2016).

L'ensemble de ces observations corroborent l'implication des cellules microgliales dans les pathologies neurodéveloppementales, mais on ignore si les interactions entre microglie et neurones au cours du développement constituent l'événement déclencheur qui affectera à long terme les fonctions des réseaux synaptiques dans ces maladies.

VI. Le cortex somatosensoriel primaire de rongeur comme modèle d'étude du développement synaptique

Le cortex cérébral est une structure fascinante au sein de laquelle se produisent les processus cognitifs les plus performants, comme la conscience, les émotions, la mémoire, le langage, le raisonnement… ainsi que la perception, dont fait partie le traitement de l'information sensorielle.

Le système des tonneaux (les « *barrels* ») du cortex somatosensoriel reliés aux vibrisses des rongeurs est devenu un des modèles de microcircuit cortical le mieux compris au niveau de ses propriétés cellulaires et synaptiques. Les étapes du développement de cette structure corticale sont également bien connues et son organisation particulière présente un certain nombre d'avantages facilitant l'étude des interactions microglie-synapses.

1. Des vibrisses au cortex somatosensoriel primaire, une somatotopie parfaitement conservée

Les rongeurs, animaux nocturnes qui passent leur vie dans des terriers sombres et étroits, ont un système somatosensoriel adapté à l'exploration tactile, de la forme de leurs vibrisses à leurs mouvements, afin de pallier la pauvreté des informations visuelles. En d'autres termes :

“*Eyes may be 'the window to the soul' in humans, but whiskers provide a better path to the inner lives of rodents”* (Sofroniew and Svoboda, 2015). La souris possède sur la lèvre supérieure, des deux côtés du museau, un groupe de 35 poils spécialisés provenant de follicules innervés par de très nombreuses terminaisons nerveuses, les vibrisses « mystaciales » (Welker and Van der Loos, 1986). Elles sont organisées de façon bien particulière en une matrice de 5 lignes orientées selon l’axe dorso-ventral, nommées de A à E, et de 7 arcs numérotés de 1 à 7 en direction rostro-caudale. Les mouvements de protraction et rétraction des vibrisses permettent à l’animal d’analyser tactilement les objets proches, de déterminer sa position spatiale par rapport aux objets qui l’entourent et d’obtenir des informations par rapport à leur texture. Les interactions mécaniques entre une vibrisse et un objet sont converties par la vibrisse en tensions dans le follicule pileux, et ces tensions sont transformées en influx nerveux *via* l’ouverture de canaux ioniques mécano-sensibles exprimés par les neurones sensoriels innervant le follicule pileux. Les axones de ces neurones de premier ordre forment la branche infra-orbitale du nerf trijumeau, et leurs corps cellulaires constituent le ganglion trigéminal, constituant le premier relai de l’intégration des informations somesthésiques. Le complexe trigéminal du tronc cérébral se divise en deux noyaux : le noyau principal rostral (PrV) et le noyau caudal spinal (SpV). Une fois entrés dans le tronc cérébral, les axones afférents bifurquent en branches ascendantes et descendantes. Le PrV comme le SpV envoient des projections au thalamus controlatéral, également organisé en deux principaux noyaux : le noyau ventrobasal (VB ou VPM) et le noyau posteromédial (POm) (Veinante *et al.*, 2000). Les neurones thalamiques contactent enfin le cortex somatosensoriel primaire (S1), dernier niveau d’intégration de l’information tactile provenant des vibrisses (**Fig. 4**). Comme les autres aires corticales, le cortex en champs de tonneaux est organisé selon un mode laminaire, en 6 couches numérotées de 1 à 6 et présentant différents types cellulaires et connectivités. Trois voies glutamatergiques anatomiquement distinctes relaient les informations somatosensorielles du tronc cérébral au cortex. La principale voie de transmission est dite lemniscale, et projette du PrV au VB, puis les axones thalamiques du VB ont pour cible principale la couche 4 (L4) de S1, mais contactent aussi les couche 5B et 6A ((Bernardo and Woolsey, 1987), **Fig. 5**). Les neurones de la couche 6A forment des connexions corticothalamiques dans le VB, témoignant de l’existence d’un contrôle rétroactif. La voie lemniscale achemine les informations concernant le mouvement des vibrisses (le « *whisking* ») et l’exploration active (« *touch* ») (Yu *et al.*, 2006). La voie paralemniscale relaie les signaux du SpV au POm et à la zona incerta. Le POm contacte ensuite les régions septales de la couche 4, les couches 5a et 1, ainsi que le cortex somatosensoriel secondaire S2

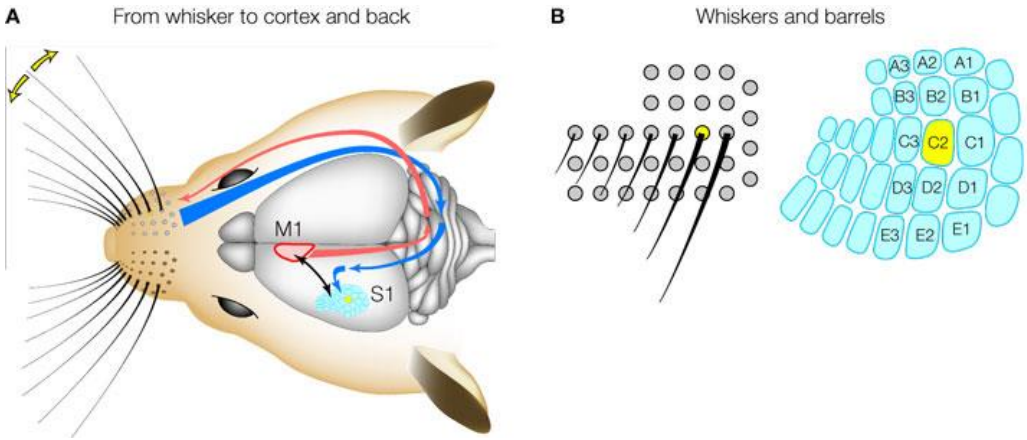


Figure 4. Représentation schématique du système somatosensoriel des vibrisses. (A) La déflection d'une vibrisse évoque des potentiels d'action dans les neurones sensoriels trijumeaux du nerf trigéminal, qui libèrent alors du glutamate au niveau du premier relai synaptique dans le tronc cérébral. Les neurones du tronc cérébral envoient ensuite l'information sensorielle au thalamus où une deuxième synapse glutamatergique excite les neurones thalamocorticaux qui projettent dans le cortex somatosensoriel primaire S1. L'information est alors transmise au cortex moteur M1, qui régule ensuite le mouvement des vibrisses. Le panneau **(B)** montre la correspondance entre les vibrisses et les tonneaux de la L4 du cortex somatosensoriel. L'information sensorielle acquise par une vibrisse individuelle passe par le thalamus ventrobasal (VPM) et arrive dans un tonneau de la L4. (Aronoff and Petersen, 2008)

et le cortex moteur primaire M1, relayant les informations relatives au whisking (Yu *et al.*, 2006). La troisième voie, appelée extralemniscale, envoie des projections aux septa de la L4, mais aussi aux couches 4 et 6 de S2 ; et cette dernière ne relaie que des informations inhérentes au toucher actif.

Une remarquable caractéristique de ce système réside dans la préservation de la représentation somatotopique des vibrisses au niveau de chaque relais de la voie lemniscale classique : à chaque vibrisse est associé un « *barrelette* » dans le tronc cérébral, un « *barreloid* » dans le thalamus et un « *barrel* » ou tonneau dans la L4 (**Fig. 6**). La disposition topologique des neurones de chaque relai reflète en effet celle des récepteurs tactiles périphériques controlatéraux, c'est-à-dire les vibrisses sur le museau des rongeurs. Elles sont représentées dans la couche 4 de S1 par des arrangements cylindriques de neurones, d'où l'appellation de « tonneaux » ; organisés comme les vibrisses en 5 lignes et 7 arcs. Les données anatomiques et électrophysiologiques ont en effet révélé que chaque vibrisse se projette préférentiellement sur un tonneau (Woolsey and Van der Loos, 1970). Le fait que les projections entre vibrisses et tonneaux soient très bien définies et facilement manipulables fait de ce cortex un excellent

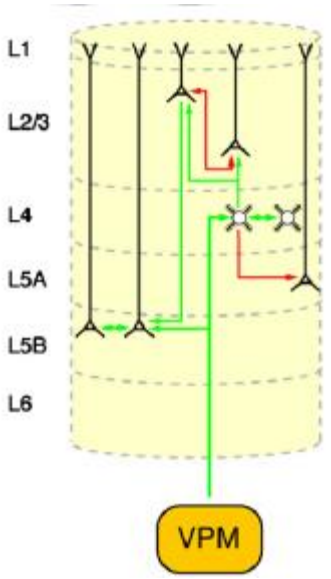


Figure 6. La voie lemniscale canonique relayant l'information sensorielle du thalamus au cortex somatosensoriel primaire. Le thalamus est représenté par un seul *barreloid* dans le VPM et envoie majoritairement des afférences dans la couche 4, ainsi que dans une moindre mesure dans la couche 5B. Les cellules épineuses étoilées de la couche 4 (voir paragraphe suivant) forment des connexions intracorticales avec leurs voisines et envoient leurs afférences aux cellules pyramidales des couches superficielles, qui elles envoient des projections aux couches profondes. Les connexions synaptiques impliquées dans le circuit corticothalamique rétroactif mettant en jeu les neurones pyramidaux de la couche 6 ne sont pas représentés ici (Adapté de (Feldmeyer *et al.*, 2013)).

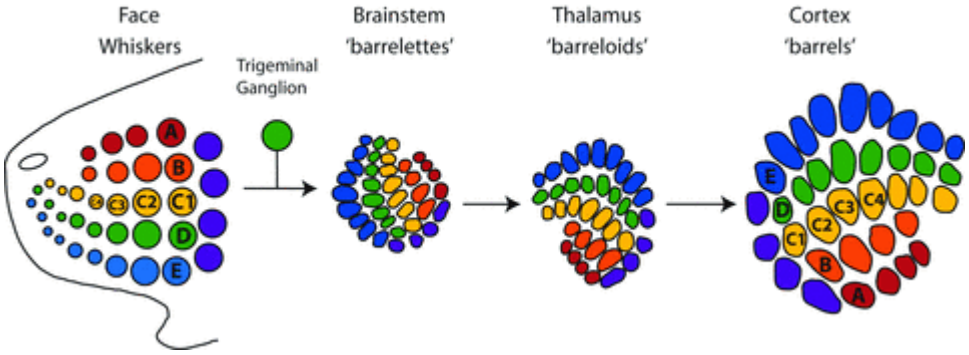


Figure 5. Conservation de l'organisation spatiale des vibrisses à chaque relai cérébral. (Adapté de (Li and Crair, 2011)).

modèle d'étude des mécanismes synaptiques lors du développement. A l'image de l'homonculus somesthésique de Penfield, la carte associant la surface du cortex somatosensoriel à une partie du corps dont la représentation est proportionnelle à la finesse de la sensibilité chez l'Homme, Woolsey dessina la « mouseunculus », montrant que les vibrisses dominent la carte somatotopique en couvrant environ 40% de la surface du cortex somatosensoriel (Woolsey and Van der Loos, 1970).

2. Organisation cellulaire et fonctionnelle des tonneaux

Bien que les cortex sensoriels primaires aient différentes fonctions, ils partagent quelques caractéristiques en termes de structure et de traitement de l'information, dont l'organisation cytoarchitectonique en colonne. Les colonnes corticales constituent les modules fonctionnels du cortex et les neurones appartenant à une même colonne ont des champs de réception identiques. Dans le cortex en champs de tonneaux, des colonnes d'environ 20 000 neurones excitateurs et inhibiteurs traitent l'information de vibrisses individuelles (Feldmeyer, 2012 ;

Harris and Shepherd, 2015). Les afférences thalamocorticales des neurones du VPM envoient leurs terminaisons neuronales principalement dans la couche 4, et se concentrent en différents ensembles pour former chaque tonneau, c'est ce qui permet d'ailleurs de les visualiser. Les somas des cellules principales de la couche 4, qui comprennent principalement de cellules épineuses étoilées (« *spiny stellate neurons* », SSN) et quelques cellules pyramidales et pyramidales étoilées (Brecht and Sakmann ; Staiger), forment les parois des tonneaux, et s'organisent autour d'un « creux » (Woolsey and Van der Loos, 1970), la densité cellulaire au centre des tonneaux étant en effet plus faible. Les neurones excitateurs des tonneaux orientent préférentiellement leurs dendrites vers le centre des tonneaux, où ils sont contactés par les axones thalamocorticaux (**Fig. 7**) pour former les synapses thalamocorticales excitatrices, ainsi que par les interneurones corticaux locaux, également contactés par les fibres thalamiques. Le centre des tonneaux contient donc principalement les axones thalamocorticaux et intracorticaux, les dendrites des neurones de la couche 4, quelques somas, et des cellules gliales (microglie et astrocytes) (Lübke *et al.*, 2000). Les tonneaux sont séparés par des septa, larges chez le rat, qui contiennent des microcircuits différents de l'intérieur des tonneaux (Brecht and Sakmann, 2002). Ces septa sont bien plus étroits chez la souris, chez laquelle deux tonneaux adjacents sont presque apposés l'un à l'autre, mais dans lesquels se trouvent quelques interneurones inhibiteurs (Shigematsu *et al.*, 2018).

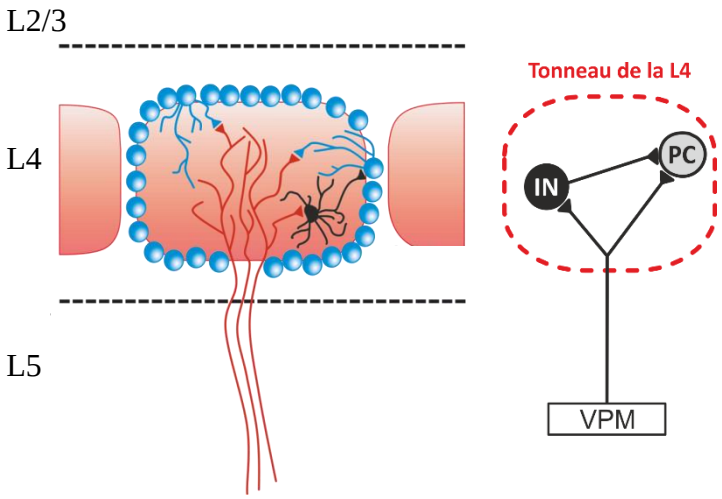


Figure 7. Les synapses thalamocorticales excitatrices et inhibitrices au sein d'un tonneau. Les afférences thalamiques partant du VPM regroupées en cluster (en rouge) forment des synapses glutamatergiques avec les cellules principales de la couche 4 (en bleu, PC) localisées en périphérie des tonneaux, ainsi qu'avec les interneurones inhibiteurs (en noir, IN) responsables de l'inhibition antérograde (« *feedforward* ») des neurones principaux.

2.1. Les cellules excitatrices de la couche 4 du cortex en champ de tonneaux

Le cortex en champ de tonneau contient une majorité de neurones excitateurs glutamatergiques (80% ou plus) qu'on trouve au sein de toutes les couches, mais principalement dans les L2/3, L5 et L6. Cette population est composée principalement de cellules pyramidales, caractérisées par un soma triangulaire, une dendrite apicale proéminente

s'étendant vers la surface du cortex et des dendrites latérales partant de la base du corps cellulaire. Dans les tonneaux de la L4, on retrouve également une majorité de cellules excitatrices, mais peu de ces cellules pyramidales. Une des particularités de la L4 réside dans sa population comportant une majorité de SSNs (~58%), ainsi que quelques cellules pyramidales étoilées (~25%) et peu de cellules pyramidales (~17%) (**Fig. 8**). Il faut toutefois noter que ces pourcentages ont été obtenus chez le jeune rat à P20 (Staiger, 2004). Les 3 types de neurones principaux étant intriqués dans divers réseaux neuronaux, afférents et efférents, il s'agit d'interneurones. Cependant, puisque dans le cerveau, la majorité des interneurones sont inhibiteurs, on utilisera ce terme plutôt pour décrire les interneurones inhibiteurs. Les SSN ont été nommées ainsi d'après leur apparence rappelant des étoiles, et la présence d'un grand nombre d'épines au niveau de leurs dendrites. Leur soma ovoïde ne présente pas dendrite apicale comme les pyramides, il est relativement petit (~15 microns), et 3 à 8 dendrites primaires en émerge et se ramifient en dendrites secondaires, tertiaires, etc, densément recouvertes d'épines dendritiques. L'arborisation dendritique des SSN de la L4 est principalement restreinte au volume formé par le tonneau contenant leur soma, et leurs projections axonales sont confinées à la colonne corticale, ce qui n'est pas nécessairement le cas des cellules pyramidales de L4 (Lübke *et al.*, 2000).

2.2. Les interneurones inhibiteurs de la couche 4 du cortex en champ de tonneaux

On compte dans le cortex en champ de tonneaux environ 12% interneurones inhibiteurs (Lefort *et al.*, 2009). Ces neurones sont des cellules GABAergiques non pyramidales possédant peu d'épines et des axones relativement courts projetant à l'intérieur de la colonne corticale, ou parfois à la colonne voisine. La population de neurones inhibiteurs du cortex en champ de tonneaux regroupe tous les types d'interneurones présents dans le néocortex (Markram *et al.*, 2004) et présentent des morphologies, des marqueurs biochimiques, des

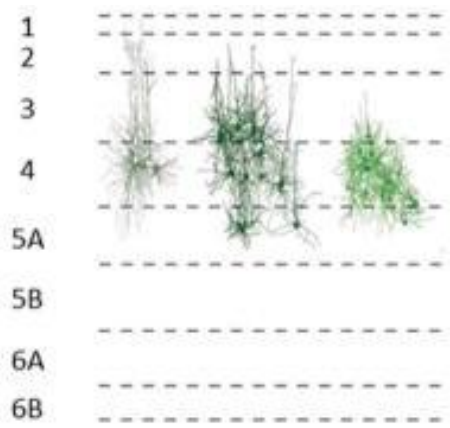


Figure 8. Les différentes morphologies dendritiques des neurones excitateurs de la couche 4 du cortex somatosensoriel. De gauche à droite, les interneurones excitateurs pyramidaux, pyramidaux étoilés, et étoilés épineux. (Adapté de (Harris and Shepherd, 2015)).

propriétés électrophysiologiques et des connectivités très variées. Les interneurones GABAergiques sont en effet célèbres pour leur hétérogénéité, et cette diversité a mené à plusieurs classifications ayant pour but d'identifier des populations pertinentes d'un point de vue fonctionnel, mais des divergences résultent du chevauchement des caractéristiques de ces sous-types (DeFelipe *et al.*, 2013). Il est néanmoins admis que trois grandes classes d'interneurones corticaux peuvent être définies en fonction de l'expression de marqueurs de liaison au calcium. On distingue ainsi les interneurones exprimant la parvalbumine (PV), l'hormone peptidique somatostatine (SST) et le récepteur ionotropique à la sérotonine 3a (5-HT3aR) ; l'expression de ces trois protéines ne se chevauchant pas et représentant quasiment 100% des interneurones corticaux (Lee *et al.*, 2010 ; Rudy *et al.*, 2011). Chez les adultes, les interneurones PV représentent environ 40% des interneurones corticaux, tandis que les interneurones SST et 5-HT3aR en regroupent environ 30% chaque.

Au sein de la L4, un tonneau contient à peu près 4000 neurones, dont seuls 8% sont des interneurones inhibiteurs (Meyer *et al.*, 2011). Les interneurones de la L4 du cortex somatosensoriel n'ont pas reçu autant d'attention que leurs voisins excitateurs, mais de plus en plus de recherches s'y intéressent ces dernières années. On trouve différents types d'interneurones au sein de la L4 de S1, qui ont souvent été regroupés en fonction de leur profil de décharge de potentiels d'action : « *fast-spiking* » (FS), ou non-FS (nFS).

La majorité des interneurones de la L4 (~60%) expriment la PV et sont FS (Rudy *et al.*, 2011). Les interneurones PV et FS peuvent être classés selon leur cible postsynaptique en « *basket cells* », cellules en « panier » qui contactent le soma et les dendrites proximales, ou en neurones « chandelier » qui eux contactent le segment initial des axones des cellules pyramidales. La plupart de ces interneurones PV et FS de la L4 sont caractérisés leur morphologie en « panier » et par leur arborisation axonale très touffue, confinée à l'intérieur d'un tonneau, et dont la connectivité synaptique est très dense (Koelbl *et al.*, 2015). Ces neurones sont responsables de l'inhibition « *feedforward* » (antérograde) (**Fig. 7 et 9**), même si selon certaines études, des neurones nFS participeraient aussi à l'inhibition *feedforward* s'exerçant sur les cellules principales de la L4 (Porter *et al.*, 2001). Les interneurones PV FS pourraient être divisés en différents sous-groupes fonctionnels en fonction de leur profil de décharge, les « *delayed firing* » et les « *early onset firing* » (Li and Huntsman, 2014). Récemment, une nouvelle classification des interneurones FS a été proposée, basée sur le ratio d'axone contenu dans le tonneau ou la colonne corticale auxquels appartient le soma (Koelbl *et al.*, 2015). Les auteurs ont trouvé 3 sous-groupes, dont des interneurones ayant une forte

connectivité et confinés à l'intérieur d'un tonneau, présentant des caractéristiques de cellules en panier, mais ne contactant pas de façon prédominante le compartiment périsomatique de ses cibles, ce qui contredit d'autres études (Rudy *et al.*, 2011). Encore plus récemment, il a été suggéré qu'il existe 4 sous-classes d'interneurones PV dans les tonneaux, déterminées selon la localisation de leur soma/dendrites dans ou entre les tonneaux ainsi que leur interconnectivité par les jonctions gap (Shigematsu *et al.*, 2018). Les interneurones peuvent effectivement communiquer par le biais de synapses chimiques mais aussi électriques *via* les jonctions gap, des connexions intercellulaires spécialisées constituées d'hémi-canaux de connexines exprimés par chaque cellule. On retrouve ce type de connectivité essentiellement entre les interneurones FS, et elle est connue pour son rôle dans la synchronisation de décharge des interneurones ou la régulation des oscillations du réseau. Les auteurs montrent que les 4 types d'interneurones PV ont des architectures dendritiques bien distinctes, et il est intéressant de noter que i) les interneurones PV du premier groupe confinés à l'intérieur d'un tonneau ne sont pas couplés entre eux par les jonctions gap (contrairement à l'idée générale que les interneurones d'une même sous-population s'organisent en réseau) ii) que deux populations sont caractérisées par la présence de leurs somas (et pour l'une aussi de l'arborisation dendritique) dans les septa, donc en dehors des tonneaux (Shigematsu *et al.*, 2018).

Les interneurones nFS ont été décrits comme des neurones à bas seuil de décharge (LTS pour « *low-threshold spiking* ») ou à profil de décharge régulier (RNSP pour « *regular-spiking non pyramidal cell* ») (Porter *et al.*, 2001 ; Sun *et al.*, 2006). Cependant, peu d'études détaillées ont été effectuées sur ces populations d'interneurones nFS dans les tonneaux.

Toutes ces études confirment qu'établir une classification des interneurones est très compliqué et souffre d'un manque de consensus en ce qui concerne les paramètres de classification et la terminologie. En outre, un des problèmes des tentatives de classification des interneurones réside dans le fait que les données électrophysiologiques ont été obtenues principalement avant P30, âge auquel les propriétés de décharge des interneurones sont encore immatures (contrairement aux cellules corticales pyramidales dont la maturation du profil de décharge est finie à P20 (Le Magueresse and Monyer, 2013)). Dans la suite de ce manuscrit, nous évoquerons en parlant de l'inhibition *feedforward* uniquement les cellules FS exprimant la PV, dont de nombreuses données supportent le rôle prépondérant dans l'inhibition *feedforward* des neurones principaux de la couche 4.

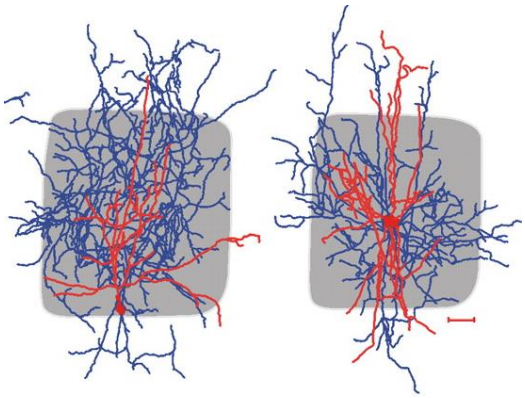


Figure 9. Interneurones en « panier » des tonneaux. Reconstruction de deux interneurones en panier de la L4 du cortex en champ de tonneau. Les dendrites sont en rouge, l'axone en bleu et les tonneaux en gris. Barre d'échelle : 100 µm. (D'après (Sun *et al.*, 2006)).

2.3. Connectivité thalamocorticale et intracorticale des tonneaux du cortex somatosensoriel

Les mesures électrophysiologiques montrent que les afférences contactant les SSNs de la L4 (contrairement aux cellules pyramidales de la même couche) proviennent principalement du même tonneau, donc sont cortico-corticales, et que seule une petite fraction des synapses excitatrices afférentes sur les cellules épineuses provient du thalamus (10% environ), ce qui est néanmoins suffisant pour contrôler l'activité des cellules épineuses (Benshalom and White, 1986). L'excitation provenant du VPM recrute principalement les SSNs, mais comme elle recrute également les autres types de cellules excitatrices, nous parlerons dans la suite du manuscrit des neurones corticaux glutamatergiques principaux de la L4 (PCs pour « *principal neurons* »). Les afférences thalamocorticales établissent des contacts directs à la fois avec les PCs et les interneurones GABAergiques, qui ensuite forment des connexions inhibitrices sur les PCs (voir le paragraphe VI.4.2). Les interneurones PV des tonneaux sont contactés par les collatérales des SSNs ainsi que par d'autres interneurones FS (cellules en panier) mais beaucoup moins par les interneurones RNSP (« *bitufted* »), ce qui suggère que les interneurones PV participent non seulement à l'inhibition *feedforward* mais aussi à l'inhibition *feedback* (Staiger *et al.*, 2009). En ce qui concerne les circuits intracorticaux efférents, les cellules principales projettent sur les cellules de la L2/3, forment aussi des collatérales dans la L4 et envoient des petites projections verticales aux couches corticales profondes L5a et L6, participant ainsi au contrôle rétroactif corticothalamique. Les cellules de la L4 de S1 ne contactent pas d'autres aires corticales ou structures sous-corticales.

3. Développement et période critique de plasticité développementale du cortex en champs de tonneaux

Comment se forme le cortex somatosensoriel ? Le développement des régions néocorticales se déroule selon une chronologie bien définie au cours de laquelle les neurones excitateurs et inhibiteurs, générés dans le télencéphale dorsal et ventral respectivement, migrent vers leur emplacement final (Fishell and Rudy, 201). Au fur et à mesure de leur maturation, les neurones participent aux circuits naissants et finissent par étendre leurs arborisations dendritiques et axonales pour former des connexions fonctionnelles. Durant le développement prénatal, la mise en place de la connectivité des différentes aires du cortex cérébral est principalement contrôlée par des programmes génétiques intrinsèques (Erzurumlu and Gaspar, 2012).

Le développement du système somatosensoriel suit une séquence développementale qui commence à la périphérie pour finir aux structures somatosensorielles centrales. Thalamus et cortex se développent de façon synchronisée pendant le développement embryonnaire. Les axones trigéminaux contactent le PrV vers E10 et les *barrelettes* se forment juste après la naissance. Les axones du PrV contactent le VPM vers E17, et les *barreloids* du thalamus apparaitront vers P3. A E13.5, les afférences thalamocorticales commencent leur croissance et atteignent la sous-plaque vers E18 et la plaque corticale à E19 (Rebsam *et al.*, 2002). Elles forment les connexions avec la L4 juste après la naissance (López-Bendito *et al.*, 2006).

La trajectoire des axones thalamocorticaux pour atteindre leurs cibles corticales dépend de divers des facteurs de « guidage » axonal. Une fois les axones thalamocorticaux ayant atteint le cortex, la formation des circuits corticaux de S1 dépend principalement de l'activité spontanée et sensorielle évoquée, donc extrinsèque (Allène *et al.*, 2008 ; Erzurumlu and Gaspar, 2012 ; Khazipov and Luhmann, 2006). Cette activité est d'abord relayée par la sous-plaque, une couche d'interneurones transitoires principalement GABAergiques générés très tôt dans le développement et dont les propriétés fonctionnelles sont déjà matures ((Kanold and Luhmann, 2010), voir le paragraphe VI.4.2.1). Les axones thalamocorticaux interagissent en premier lieu avec ces interneurones transitoires résidant entre la matière blanche et la plaque corticale. L'activité de la sous-plaque repose en grande partie sur des synapses électriques, ce qui permet la synchronisation des réseaux neuronaux locaux selon une dimension horizontale, constituant ainsi les « pré-colonnes corticales » (Sun and Luhmann, 2007). A P2, les afférences corticales forment des bandes horizontales dans les L4 et L6 (Rebsam *et al.*, 2002). Bien qu'une représentation topographique fonctionnelle des vibrisses puisse être observée

dans le cortex en champs de tonneaux dès la naissance, la réelle structure des tonneaux de la L4 devient visible vers P3-P4, au moment de la fermeture de la période de plasticité structurale. En effet, l'activité synaptique entre les afférences thalamocorticales et la plaque corticale en développement est essentielle pour le développement correct des tonneaux et fixe une période de plasticité critique (Lu *et al.*, 2006). Le concept de période critique a émergé suite aux études menées sur le développement du cortex visuel montrant une plasticité de la dominance oculaire à la fin du premier mois (Hubel and Wiesel, 1964). De la même façon que pour la voie rétino-géniculo-corticale, une plasticité structurale dépendante de l'activité se manifeste lors de la formation des tonneaux. En effet, les expériences pionnières de Woolsey et Van der Loos ont révélé que diverses manipulations des systèmes sensoriels – élimination des vibrisses ou section de la branche infraorbitale – avant P4 altère irréversiblement l'organisation spatiale et fonctionnelle des tonneaux dans le cortex (Erzurumlu and Gaspar, 2012 ; Woolsey and Van der Loos, 1970). L'arrivée des axones thalamocorticaux à leur cible corticale définitive et la formation subséquente des tonneaux dépend donc de l'expérience sensorielle précoce. A P4, la ségrégation des axones thalamiques est donc terminée et la représentation corticale des vibrisses se met en place. La translocation des corps cellulaires des PCs à la périphérie des tonneaux survient vers P6-7 et est accompagnée d'une réorganisation de l'arbre dendritique, qui s'oriente vers le centre des tonneaux, et une maturation des synapses thalamocorticales (Inan *et al.*, 2006). A partir de P5, une phase de synaptogenèse intense commence, et en même temps les arborisations dendritique des PCs et axonales des fibres thalamiques se complexifient, jusqu'à la fin de la deuxième semaine postnatale (Petersen, 2007).

4. Développement des synapses thalamocorticales des tonneaux

Les synapses excitatrices formées par les axones thalamocorticaux des neurones du VB sur les PCs de la L4 représentent l'entrée sensorielle majeure de la périphérie au cortex, et l'inhibition antérograde « *feedforward* » de ces neurones principaux par les interneurones de la L4, recrutés par les mêmes axones thalamocorticaux, est indispensable au développement de ce circuit néocortical. L'utilisation de tranches thalamocorticales permettant une préservation optimale des *barreloids* du thalamus VB et des connexions thalamocorticales et intracorticales entre les couches 4 et 2/3 (Agmon and Connors, 1991) a permis de générer une solide base de données concernant les propriétés des synapses thalamocorticales. Lors de la première semaine postnatale, des changements majeurs surviennent dans la fonction synaptique aux afférences thalamocorticales, coïncidant avec la période critique de plasticité

dépendante de l'expérience sensorielle dans la L4. En effet, pendant toute la période de développement postnatal précoce, les synapses corticales subissent un processus de maturation fonctionnelle caractérisé par des modifications présynaptiques (augmentation de la probabilité de libération des vésicules de neurotransmetteurs, ainsi que de la taille des vésicules, diminution du taux d'échec) et postsynaptiques (changement d'expression des récepteurs aux neurotransmetteurs, changement de composition de ces récepteurs). Ces modifications concernent la transmission excitatrice glutamatergique, mais aussi la transmission synaptique inhibitrice GABAergique.

4.1. La synapse thalamocorticale monosynaptique excitatrice

Jusqu'à P2-3, les synapses excitatrices observées par microscopie électronique au niveau des dendrites des neurones de L4 sont éparses et immatures (Dufour *et al.*, 2016), ce qui coïncide avec la maturation des axones thalamiques, dont les terminaisons forment encore une couche uniforme à cet âge-là. A partir de P5, une intense période de synaptogenèse commence, accompagnée d'une phase de maturation fonctionnelle. La synapse thalamocorticale entre les axones thalamocorticaux et les PCs de la L4 est une synapse excitatrice glutamatergique, elle repose donc sur l'activation de récepteurs glutamatergiques ionotropiques : les récepteurs AMPA (AMPAR), kaïnate (KAR) et NMDA (NMDAR). L'expression postsynaptique de ces trois types de récepteurs est finement régulée pendant le développement, ce qui induit plusieurs changements fonctionnels au cours du développement postnatal précoce.

4.1.1. Remplacement des récepteurs kaïnate par les récepteurs AMPA

La contribution relative des récepteurs AMPA et KA change au cours de la première semaine postnatale. Il semblerait que les KARs et AMPARs ne sont jamais colocalisés à la même synapse, il existe donc des synapses purement AMPA et purement KA (Kidd and Isaac, 1999). Les courants postsynaptiques excitateurs (EPSC) soutenus par les KAR à cette synapse se caractérisent par leur petite amplitude et leur cinétique de décroissance lente ; et dominent la neurotransmission entre P3 et P5. Les EPSCs soutenus par les AMPARs ont des cinétiques de décroissance presque 20 fois plus rapides (Kidd and Isaac, 1999). Entre P6 et P8, le nombre de synapses AMPA augmente au détriment des synapses KA, dont la contribution décroît fortement (**Fig. 10**). Les études de transmission quantique et des canaux unitaires des AMPARs et KARs ont en effet montré que ces deux paramètres ne changeaient pas, suggérant que les synapses KA sont progressivement remplacées par les synapses AMPA. Ce

changement développemental de neurotransmission lente à rapide sous-tendant l'intégration des signaux sensoriels permettrait une transmission plus fiable de l'activité des vibrisses (Bannister, 2005).

4.1.2. Evolution du ratio des courants AMPA/NMDA

D'autre part, la maturation fonctionnelle de la synapse thalamocorticale excitatrice se traduit également par une évolution de la proportion relative des récepteurs glutamatergiques AMPA et NMDA postsynaptiques. Lu et ses collaborateurs ont montré une augmentation de l'amplitude de la composante AMPA par rapport à la composante NMDA se traduisant par une augmentation du ratio AMPA/NMDA entre la fin de la première semaine postnatale (~0.3 à P5) et la deuxième semaine postnatale (>1 à P10) (Lu *et al.*, 2011). Cela suggère une diminution de l'amplitude des courants NMDA et/ou d'une augmentation de l'amplitude des courants NMDA à la fin de la première semaine postnatale. Cette deuxième hypothèse est soutenue par des données montrant l'incorporation progressive d'AMPAR à la synapse thalamocorticale excitatrice pendant la première semaine postnatale (Crair and Malenka, 1995). De façon intéressante, le BDNF a été identifié comme un facteur nécessaire pour la maturation de la neurotransmission soutenue par les AMPARs (Itami *et al.*, 2003). Cette incorporation d'AMPARS à la fin de la première semaine postnatale coïncide avec un changement de composition en sous-unités des NMDAR, de GluN1/GluN2B à GluN1/GluN2A (Lu *et al.*, 2001), processus également associé la maturation fonctionnelle de la synapse thalamocorticale

Les NMDARs sont notamment connus pour leur implication dans le contrôle de la plasticité à long terme. En effet, en plus de ces changements synaptiques sous-tendant la maturation fonctionnelle de la synapse thalamocorticale, l'expression de plusieurs types de plasticité, à court et long terme, ont été observés pendant le développement de cette synapse.

4.1.3. Période critique de plasticité fonctionnelle à la synapse thalamocorticale

La potentialisation à long terme (LTP) se traduit par une augmentation sur la durée de la force synaptique dépendante de l'activité, reposant la plupart du temps sur des mécanismes impliquant l'activation des NMDARs. Dans la majeure partie des cas, la LTP est induite par l'influx de calcium *via* l'ouverture des NMDARs et entraîne l'incorporation d'AMPARs à la membrane postsynaptique. A la synapse thalamocorticale, la LTP est nécessaire pour l'établissement des cartes corticales et dépend de l'activité sensorielle. Elle coïncide en effet

avec la période critique d'établissement des champs de réception dans la L4 (Foeller and Feldman, 2004). La LTP à la synapse thalamocorticale dépend des NMDARs et résulte de la transition d'une transmission synaptique lente soutenue par les KAR à une transmission rapide dominée par les AMPARs (Bannister, 2005 ; Kidd and Isaac, 1999) dont nous parlions précédemment. La LTP ne peut être induite que durant la première semaine postnatale, entre P3 et P7 (Crair and Malenka, 1995) (**Fig. 10**). La période critique pour induire cette plasticité fonctionnelle coïncide donc avec le changement de sous-unité des NMDARs. Lu et collaborateurs ont testé l'hypothèse d'un lien entre ces deux évènements en utilisant des souris dont le gène codant pour la sous-unité GluN2A est invalidé. Chez ces souris, la période critique d'induction de la plasticité à long terme est inchangée, indiquant que la régulation des sous-unités des NMDARs n'est pas impliquée dans la fermeture de cette période critique (Lu *et al.*, 2001).

La LTP a été proposé comme mécanismes permettant l'incorporation rapide d'AMPARs aux synapses « silencieuses ». L'existence de synapses silencieuses à la synapse thalamocorticale a été observée pendant le développement (Isaac *et al.*, 1997). Ces synapses silencieuses expriment uniquement des NMDARs, mais l'induction de la LTP à ces synapses peut promouvoir l'apparition d'AMPARs à la membrane du neurone postsynaptique. Ces synapses silencieuses disparaissent après P8 (**Fig. 10**), stade du développement auquel on perd également la capacité à induire la LTP. Cette conversion des synapses silencieuses pourrait aussi participer à l'augmentation du ratio AMPA/NMDA décrit précédemment. Il est intéressant de noter que le BDNF a été identifié comme facteur déclenchant « l'activation » des synapses silencieuses, en activant le trafic des AMPARs aux synapses en développement (Itami *et al.*, 2003).

La synapses thalamocorticale peut également exprimer de la dépression à long terme (LTD), qui comme la LTP est dépendante des NMDAR pendant le développement (Feldman *et al.*, 1998). (**Fig. 10**). La capacité à induire cette LTD décroît également pendant le développement, et comme la LTP, il n'est quasiment plus possible de l'induire à P10. Les études *in vivo* suggèrent que la LTD serait importante pour la plasticité dépendante de l'activité sensorielle dans le cortex en champ de tonneaux (Daw *et al.*, 2007), en affaiblissant les synapses inappropriées, ce qui favoriserait un élagage synaptique.

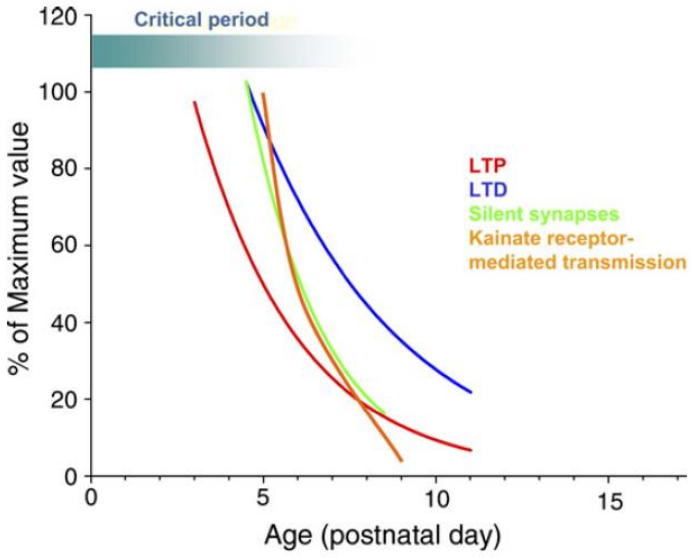


Figure 10. Profil développemental des propriétés et de la plasticité synaptique à la synapse thalamocorticale de la couche 4 du cortex en champ de tonneaux. La période critique de plasticité structurale est indiquée également pour la comparaison temporelle (Daw *et al.*, 2007).

Enfin, une plasticité à court terme est exprimée et évolue à la synapse thalamocorticale pendant les premières semaines. Cette plasticité est mesurée par le ratio des courants appariés (*paired-pulse ratio* PPR), qui consiste à diviser l'amplitude du deuxième EPSC par celle du premier EPSC, afin de déterminer si une facilitation ou une dépression de la transmission synaptique est induite, phénomènes reposant principalement sur la probabilité de relargage des vésicules de neurotransmetteur. Le PPR des NMDARs augmente entre P4 et P22, tandis que celui des AMPARs diminue, indiquant respectivement une diminution et une augmentation de la probabilité de libération de glutamate par les fibres thalamiques (Yanagisawa *et al.*, 2004). Cette divergence est due à l'existence de deux profils présynaptiques différents des synapses thalamocorticales pendant le développement précoce. En effet, les synapses immatures contenant très peu d'AMPAR postsynaptiques, c'est-à-dire des synapses silencieuses, présentent très peu d'échecs (Montgomery *et al.*, 2001) ainsi qu'une probabilité de libération plus élevée qu'aux synapses plus mûres, riches en AMPAR. Cela suggère que l'élimination progressive des 20-40% (Isaac *et al.*, 1997) de synapses thalamocorticales silencieuses (purement NMDAR) entre P2 et P8 entraine une diminution des axones à haute probabilité de libération auxquels elles sont préférentiellement associées. En d'autres termes, la conversion postsynaptique des synapses silencieuses en synapses contenant principalement des AMPAR s'accompagne d'une diminution de la probabilité de libération au niveau présynaptique, probablement *via* un médiateur rétrograde. Ainsi, les terminaisons thalamocorticales ayant une probabilité de libération transitoirement plus élevée contacteraient majoritairement les synapses silencieuses et l'interaction entre les sites pré- et

postsynaptiques au cours de la première semaine postnatale permettrait l'incorporation d'AMPAR et la maturation des synapses thalamocorticales.

4.2. Développement de la voie thalamocorticale disynaptique inhibitrice

Pendant le développement postnatal précoce, les interneurones inhibiteurs sont des contributeurs essentiels à différentes phase de formation des circuits. Tout d'abord, l'activité GABAergique, sous forme de potentiels dépolarisant géants (GDP), représente un mécanisme clé dans la synchronisation des neurones pendant la période précoce de synaptogenèse (Allène *et al.*, 2008 ; Bonifazi *et al.*, 2009). D'autre part, les premiers neurones générés dans le cortex sont des interneurones inhibiteurs dont la connectivité transitoire est essentielle au bon développement des réseaux neuronaux (Kanold and Luhmann, 2010). Enfin, la signalisation GABAergique contrôle l'affinement des circuits en réponse à l'expérience sensorielle (Hensch, 2005). Ces rôles de la transmission GABAergique pendant le développement coïncide avec l'émergence des différents sous-types d'interneurones. La génération des GDP repose sur l'existence d'interneurones SST, alors que l'affinement sensoriel et la période de plasticité critique coïncident avec la maturation relativement tardive des interneurones PV. La communication synaptique périnatale inhibitrice repose principalement sur les jonctions « *gap* » (Khazipov and Luhmann, 2006). Le nombre de jonctions gap, comme pour les synapses glutamatergiques silencieuses dont nous parlions précédemment, diminue au cours des deux premières semaines postnatales (Valiullina *et al.*, 2016). La densité des synapses chimiques augmente considérablement dès la deuxième semaine postnatale (De Felipe *et al.*, 1997).

4.2.1. Développement des circuits GABAergiques et maladies neurodéveloppementales

Le GABA (acide γ-aminobutyrique) est le principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC, il agit au travers des récepteurs ionotropiques $GABA_A$ ($GABA_AR$) et $GABA_c$ ainsi que du récepteur métabotropique $GABA_B$.

Les sous-unités du $GABA_AR$ forment un pore sélectivement perméable aux ions chlore (Cl^-) et bicarbonates lors de la fixation du GABA sur le récepteur. Le flux de l'anion suit le gradient électrochimique et en général, les ions Cl^- sont plus concentrés dans la matrice extracellulaire que dans la cellule, donc l'ouverture du canal déclenche un influx de Cl^- dans la cellule. Cette entrée d'ions négatifs est responsable de l'hyperpolarisation de la membrane, ce qui explique son effet inhibiteur. Le GABA contrôle donc l'excitabilité neuronale,

l'intégration synaptique, la plasticité et la génération d'oscillations synchronisées au sein de population de neurones excitateurs. Mais les interneurones contribuent également à presque tous les processus fondamentaux du développement cortical. En effet, le GABA n'est cependant pas toujours hyperpolarisant, notamment pendant le développement. L'effet dépolarisant du GABA repose sur l'expression finement régulée au cours du développement des co-transporteurs cation-Cl^- , Na^+-K^+-Cl^- isoforme 1 (NKCC1) et K^+-Cl^- isoforme 2 (KCC2). On considère que le GABA dépolarisant au cours du développement agit comme un facteur trophique, en induisant une augmentation du calcium intracellulaire suite à la dépolarisation, pendant une période où les synapses glutamatergiques sont plutôt quiescentes (Cherubini *et al.*, 1991). Le GABA excitateur au cours du développement est donc impliqué dans de nombreux processus de neurogenèse, incluant la prolifération des neurones, leur migration, leur différentiation, ainsi que dans la formation précoce des circuits et le développement des périodes critiques (Marty and Llano, 2005).

Un nombre croissant de preuves fondamentales et cliniques soutiennent une implication des dysfonctionnements GABAergiques développementaux dans l'étiologie de divers troubles neurodéveloppementaux (Chattopadhyaya and Cristo, 2012 ; Kanold and Luhmann, 2010 ; Kroon *et al.*, 2013 ; Wu and Sun, 2015).

Il a notamment été observé des anomalies de la matière blanche. Au cours du développement précoce, les interneurones GABAergiques établissent des réseaux transitoires (voir le paragraphe suivant), fondamentaux pour le développement subséquent des circuits corticaux, et plusieurs études pointent une implication de ces réseaux dans l'apparition de la schizophrénie. L'analyse de tissus cérébraux humains a montré une augmentation significative de la densité de ces neurones interstitiels de la matière blanche, fréquemment accompagnée d'un déficit d'interneurones inhibiteurs dans le cortex. Cela suggère que la migration des interneurones de la substance blanche vers le cortex serait anormale chez les patients schizophrènes. Ces observations sont corroborées par la coïncidence temporelle entre le deuxième trimestre de grossesse, période durant laquelle une atteinte menant à la schizophrénie est la plus susceptible de survenir, et le pic d'expression de l'enzyme de synthèse du GABA, GAD67, dans la sous-plaque et la matière blanche, indiquant une période de migration intense. Cette période de migration des neurones GABAergiques pourrait être une période de vulnérabilité pour le développement de dysfonctionnements corticaux de type schizophréniques (Wu and Sun, 2015).

L'idée d'une altération spécifique des interneurones GABAergiques associée à la schizophrénie, ainsi qu'aux TSA, est aussi soutenue par les analyses des tissus cérébraux de patient schizophrènes et autistes qui a révélé une sous-expression significative des enzymes de synthèse du GABA, GAD 65 et GAD67, chez ces patients (Fatemi *et al.*, 2002 ; Lewis *et al.*, 2005). Plusieurs groupes ont également montré des altérations au niveau de l'expression des GABARs.

Une dérégulation de la balance excitation/inhibition (E/I) est suspectée comme responsable des déficiences cognitives observées dans de nombreux TSA, et est souvent à l'origine de ce déséquilibre d'un défaut d'inhibition (Kroon *et al.*, 2013). De façon intéressante, une méta-analyse de l'expression de la parvalbumine a montré une réduction systématique du nombre d'interneurones PV dans les néocortex de différents modèles murins d'autisme (Gogolla *et al.*, 2009). D'autre part, un déséquilibre général des transporteurs d'ions chlore NKCC1 et KCC2 a été observé chez les patients atteints de schizophrénie, se manifestant par des ratios NKCC1/KCC2 immatures (Wu and Sun, 2015), et donc d'un effet du GABA plutôt dépolarisant à l'âge adulte.

L'ensemble de ces observations confirme donc que des altérations de la neurotransmission GABAergique durant le développement embryonnaire sont à l'origine, ou du moins participent, au développement de pathologies neurodéveloppementales. Les mécanismes cellulaires responsables de ces anomalies du développement se manifestant par des troubles cognitifs après la naissance sont encore très peu compris.

4.2.2. Les interneurones transitoires de la sous-plaque

Le cortex en développement des mammifères contient des neurones particuliers, les neurones de la sous-plaque (SPN pour « *subplate neurons*»), qui jouent un rôle fondamental lors du développement. Ce sont les premiers neurones à être générés dans le cortex, ils sont localisés dans la matière blanche et sont caractérisés par leurs propriétés fonctionnelles et structurales relativement matures comparé aux autres neurones à ces stades. Ils projettent leurs axones principalement à la L4 et forment les premiers circuits fonctionnels, requis pour la mise en place des oscillations précoces de la plaque corticale citées précédemment (Allène *et al.*, 2008 ; Kanold and Luhmann, 2010). Plusieurs études ont démontré le rôle crucial de ces réseaux transitoires de SPNs dans le développement cortical et la plasticité. Leur absence ou une altération de ces réseaux résulte en une malformation du cortex chez l'adulte et des propriétés

cognitives altérées (Kanold and Luhmann, 2010). Les SPNs sont les premiers à recevoir des afférences thalamiques à E18, et ces connexions disparaissent totalement avant P7 (**Fig. 11**).

Récemment, un nouveau circuit transitoire d'interneurones transitoires a été découvert. En utilisant la technique de LSPS (*laser-scanning photostimulation*) couplée au décageage de glutamate pour cartographier les connexions corticales, il a été montré qu'il existait dans la L5b une population d'interneurones inhibiteurs SST qui reçoivent des afférences thalamiques tôt dans le développement, de la même façon que les SPNs, mais qui forment des connexions réciproques avec les SSNs de la L4 entre P4 et P6 (Marques-Smith *et al.*, 2016), donc avant l'émergence de la *feedforward* soutenue par les interneurones locaux de la L4. Par conséquent, avant P6, les interneurones SST de la L5b régulerait l'entrée thalamique au niveau des SSNs de la L4. La formation et le désassemblage de ce circuit entre L5b et L4 dépend de l'activité sensorielle, et l'absence de ce circuit transitoire retarde la mise en place de la connectivité thalamique afférente sur les SSNs (Marques-Smith *et al.*, 2016). Les mécanismes responsables de la transition de ce circuit de neurones SST translaminaire à un

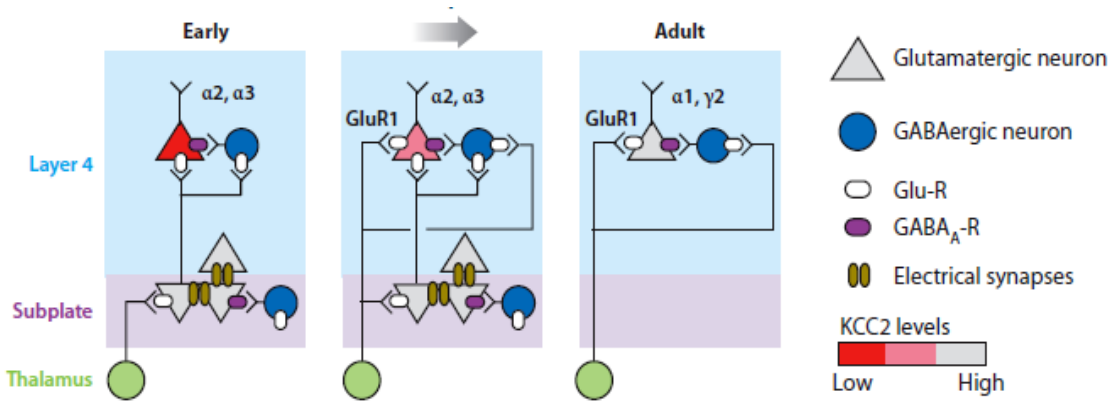


Figure 11. Les neurones transitoires de la sous-plaque participent à la maturation de la connectivité thalamocorticale inhibitrice. Ce schéma représente les changements développementaux des projections thalamocorticales et de l'inhibition intracorticale pendant le développement. Lors du développement précoce (« *early* »), le thalamus projette à la sous-plaque qui envoie des projections aux neurones excitateurs et inhibiteurs de la L4. Les neurones de la sous-plaque communiquent *via* des synapses électriques. A ce stade, le GABA est dépolarisant dans la L4 car l'expression du co-transporteur d'ions chlore KCC2 est minoritaire ; en revanche, les neurones de la sous-plaque ont des propriétés de neurones matures et donc une expression de KCC2 adulte. Les récepteurs GABAergiques sont composés principalement des sous-unités α2 et α3. Au cours du développement (schéma du centre), les axones thalamiques s'étendent jusqu'à la couche 4 et forment des synapses glutamatergiques avec les cellules principales et les interneurones responsables de l'inhibition feedforward. Chez l'adulte, les niveaux de KCC2 sont élevés et le GABA est donc hyperpolarisant, les neurones de la sous-plaque n'existent plus. Les neurones de la L4 expriment principalement des GABA$_A$R composés de sous-unités α1 et γ2. (Adapté de (Kanold and Luhmann, 2010))

circuit intra-laminaire n'ont pas été identifiés. Cependant, les études électrophysiologiques concernant le développement de l'inhibition *feedforward* disynaptique (voir le paragraphe VI.4.2.4) dans les PCs de la L4 n'ont pas observé ce type d'inhibition disynaptique avant l'émergence de l'inhibition *feedforward* soutenue par les interneurones locaux de la L4.

L'intégration au sein de circuits en développement des d'interneurones corticaux immatures ne sont donc ni statiques ni progressivement renforcés, mais suivent selon la couche à laquelle ils appartiennent un développement spécifique impliquant des connexions transitoires qui diffèrent de celles du cerveau adulte.

4.2.3. Développement des propriétés synaptiques GABAergiques

Les récepteurs ionotropiques GABAergiques $GABA_A$ sont, comme les récepteurs glutamatergiques dont nous parlions précédemment, concernés par un changement d'expression de leurs sous-unités pendant le développement du cortex en champ de tonneaux. Il existe seize types de sous-unités pouvant composer les $GABA_AR$: α1 à α6, β1 à β3, γ1 et γ2, δ, ε, π, et ϑ (Olsen and Sieghart, 2009). Les récepteurs $GABA_A$ sont des hétéropentamères dont la combinaison comprend toujours 2 sous-unités α et deux sous-unités β (2α:2β:γ, γ pouvant être remplacée par δ, ε, π, ou ϑ), et dont la stœchiométrie la plus abondamment rencontrée dans le cerveau adulte est α1β2γ2 (Fritschy and Mohler, 1995). Généralement, les $GABA_AR$ sont postsynaptiques, bien qu'il ait été montré qu'ils pouvaient être présents au niveau présynaptique (Trigo *et al.*, 2010). Dans le néocortex de rongeur, l'expression relative des sous-unités α1, β2, γ2 augmente en effet pendant le développement. Dans le cortex en champs de tonneaux, des analyses quantitatives de la composition en sous-unités des récepteurs $GABA_A$ révèlent que les changements postnataux de composition en sous-unités α, de α2 prédominantes à α1, contribuent à l'accélération des cinétiques des courants postsynaptiques inhibiteurs (IPSC) dans le cortex somatosensoriel de souris (Dunning *et al.*, 1999).

4.2.4. La voie thalamocorticale disynaptique inhibitrice

Les afférences thalamocorticales du thalamus ventrobasal établissent des connexions excitatrices directes avec les cellules principales de la L4 du S1, mais également des connexions disynaptiques inhibitrices antérograde (« *feedforward* ») avec ces cellules, par l'intermédiaire des cellules FS de la L4 (**Fig. 7**). En d'autres termes, les axones thalamocorticaux contactent à la fois les PCs et les interneurones FS, ce qui est crucial pour la

coordination de l'excitation lors des premières étapes de l'intégration corticale des informations somatosensorielles. En effet, les interneurones connectés aux PCs et recevant les synapses glutamatergiques des axones thalamocorticaux peuvent déclencher une inhibition rapide des cellules excitatrices en tronquant la réponse thalamocorticale, ce qui permet de limiter la fenêtre temporelle d'intégration de l'excitation thalamique (Gabernet *et al.*, 2005).

Les interneurones GABAergiques FS de la L4 responsables de l'inhibition *feedforward* sont contactés par les afférences thalamiques vers P6-P7 (Daw *et al.*, 2007). La quantification de la synaptogenèse inhibitrice dans le cortex en champs de tonneaux montre que le nombre de synapses inhibitrices triple entre P4 et P11 (De Felipe *et al.*). Il a été montré que le GABA était également dépolarisant dans le cortex en champs de tonneaux pendant la première semaine postnatale (voir paragraphe précédent, (Daw *et al.*, 2007), mais à ce moment du développement, les interneurones GABAergiques ne sont pas encore intégrés au sein du réseau de la L4. Ils ne sont recrutés dans le circuit *feedforward* qu'à la fin de la première semaine postnatale (**Fig. 12**). De plus, la densité et la force des synapses inhibitrices

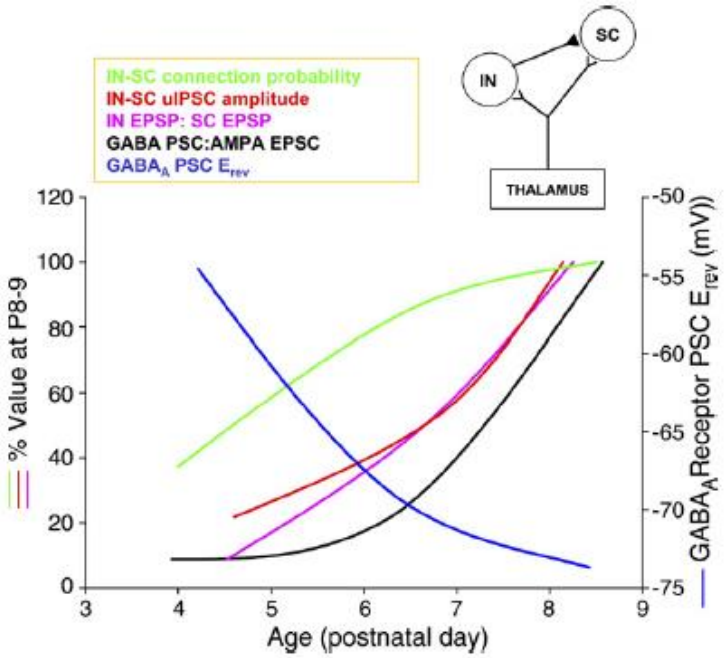


Figure 12. Profil développemental de l'inhibition GABAergique dans la couche 4 du cortex en champs de tonneaux. Le taux de connexion entre interneurone (IN) et PCs (SC pour stellate cell) en vert, et l'amplitude des connexions unitaires en rouge ont été déterminées suite à des enregistrements en paire. Les EPSPs mesurés dans les deux types de cellules (en rose) indiquent les EPSPs évoqués simultanément par stimulation thalamique dans les IN et SC connectés. Le ratio $GABA_A$/AMPA est représenté en noir, et le potentiel d'inversion (E_{rev}) en bleu. Il s'agit du E_{rev} des IPSCs pharmacologiquement isolé évoqués dans les SC par une stimulation locale et en patch perforé (Daw *et al.*, 2007).

intracorticales dans la L4 augmentent entre P8 et P18, entraînant une augmentation de la balance inhibition/excitation (Zhang *et al.*, 2011). Un développement approprié du réseau inhibiteur est fondamental car il fixe la période développementale critique de plasticité (Daw *et al.*, 2007). Le GABA est par conséquent un neurotransmetteur essentiel pour l'induction de la période critique (Fagiolini and Hensch, 2000). De façon similaire au ratio AMPA/NMDA, la comparaison de l'amplitude des EPSCs soutenus par les AMPARs par rapport à l'amplitudes des IPSCs soutenus par les $GABA_A$Rs permet de déterminer les contributions relatives de l'excitation et de l'inhibition de la voie thalamocorticale pendant le développement. En accord avec les données d'anatomie (De Felipe *et al.*, 1997), le ratio $GABA_A$/AMPA augmente considérablement entre la première et la deuxième semaine postnatale ((Chittajallu and Isaac, 2010) ; **Fig. 12**).

Bien que les mêmes afférences du VPM contactent les cellules principales et les FS, les entrées thalamocorticales excitatrices sur les interneurones inhibiteurs sont remarquablement plus fortes et rapides que celles sur les PCs (Chittajallu and Isaac, 2010 ; Cruikshank *et al.*, 2007 ; Gabernet *et al.*, 2005). Des études électrophysiologiques ont montré que toutes les afférences thalamiques contactant les PCs excitent également les cellules FS adjacentes et qu'une cellule FS reçoit une convergence d'entrées excitatrices provenant de différents neurones du VPM et établit des connexions inhibitrices avec plusieurs cellules principales de la L4 (Inoue and Imoto, 2006). Il a été montré que cette excitation différentielle des différents neurones corticaux repose sur des mécanismes postsynaptiques. En effet, les récepteurs exprimés au niveau des cellules FS et principales de la L4 diffèrent en termes d'identité et de composition, entrainant des réponses différentes pour une même libération de neurotransmetteur par les fibres thalamiques (Hull *et al.*, 2009). Aux synapses FS, les afférences thalamiques produisent des EPSCs rapides d'une amplitude quantique quatre fois plus grande que ceux évoqués dans les PCs, et cela est dû à l'activation de récepteurs AMPA ne possédant pas de sous-unité GluA2. En effet, les AMPARs dépourvus de GluA2 ont une conductance unitaire bien plus grande que les AMPARs contenant GluA2. L'expression de ce type particulier d'AMPAR à la membrane postsynaptique des interneurones FS explique sans doute en partie les réponses thalamocorticales plus efficaces dans ces interneurones, permettant d'engager l'inhibition *feedforward* disynaptique de façon fiable. D'autre part, l'excitation thalamique des cellules excitatrices est soutenue majoritairement par les récepteurs NMDA ayant des cinétiques plus lentes et passent plus de courant aux potentiels physiologiques (Hull *et al.*, 2009). L'activation des fibres thalamiques entraine donc des

réponses différentes selon le type cellulaire ciblé dans la L4, cette divergence est uniquement due à des compositions spécifiques de récepteurs postsynaptiques, et permet afin d'orchestrer une balance dynamique entre excitation et inhibition lors de l'entrée sensorielle dans le cortex.

Mais quel mécanisme contrôle l'évolution de ces propriétés synaptiques ? Grâce à des expériences de privation sensorielle (cautérisation des vibrisses entre P5 et P10), il a été montré que l'activité des vibrisses est nécessaire pour la maturation fonctionnelle de la synapse thalamocorticale disynaptique inhibitrice des tonneaux. Chittajallu et Isaac ont en effet découvert que l'expérience sensorielle induit deux formes de plasticité synaptique à cette synapse (Chittajallu and Isaac, 2010). Au niveau de la première synapse de l'inhibition *feedforward* disynaptique, entre les fibres thalamiques et les interneurones FS, l'activité des vibrisses provoque une augmentation de la probabilité de libération aux terminaisons axonales des fibres thalamiques à partir de P6. Pour que cette augmentation de l'inhibition *feedforward* fixe efficacement la durée restreinte d'intégration des entrées sensorielles dans les PCs (Gabernet *et al.*, 2005), un deuxième mécanisme dépendant de l'expérience est mis en jeu, au niveau postsynaptique cette fois. A P6-8, les réponses monosynaptiques évoquées dans les PCs sont de larges EPSPs avec une forte composante médiée par les NMDARs qui est diminuée à P9-11 et s'oppose moins à l'inhibition disynaptique, suggérant que l'expérience sensorielle entraine une diminution de cette composante NMDA des PCs, permettant la mise en place de l'inhibition *feedforward* mature. Le changement de composition en sous-unité des NMDARs est probablement impliqué dans ce mécanisme postsynaptique, mais cela reste à tester.

Ces modifications synaptiques déclenchées par l'activité sensorielle ayant pour conséquence d'augmenter de façon considérable l'inhibition des PCs sont essentielles pour maintenir l'activité des tonneaux à un niveau constant. En effet, le réseau excitateur se développe très rapidement à ces stades, il est donc fondamental de réguler la balance excitation/inhibition, en réduisant la fenêtre temporelle d'intégration des afférences sensorielles, permettant une transmission fidèle de l'activité des vibrisses.

VII. Colonisation du cortex en champs de tonneaux par les cellules microgliales lors du développement postnatal et maturation de la voie thalamocorticale

Notre groupe a précédemment découvert que les cellules microgliales suivaient un profil d'invasion remarquablement stéréotypé lors de la colonisation du champ de tonneaux.

Rappelons qu'au cours de la première semaine postnatale, la distribution des cellules microgliales dans le cortex est éparse et hétérogène comparé au cortex adulte, dans lequel la distribution des cellules microgliales est plus dense et homogène. Au cours du développement, l'augmentation de la densité microgliale dans le cortex traduit sa colonisation progressive par les cellules microgliales. Des souris transgéniques knock-in hétérozygotes exprimant l'eGFP sous le promoteur CX3CR1 spécifique de la microglie permettent d'identifier les cellules microgliales par fluorescence. Grâce à ces animaux, l'équipe a montré que jusqu'au 5ème jour postnatal, la microglie reste à la périphérie des tonneaux et est exclue des sites synaptiques, qu'elle commence à envahir seulement à partir de P6-7 (**Fig. 3A, Fig. 13** ; (Hoshiko *et al.*, 2012)). Ce recrutement de la microglie au centre des tonneaux s'accompagne d'ailleurs d'un changement transitoire du phénotype microglial (Arnoux *et al.*, 2013). Chez les souris CX3CR1 KO, cette invasion des tonneaux est retardée de deux jours (**Fig. 13**). De manière surprenante, à P7, stade auquel les cellules microgliales n'ont pas encore colonisé le centre des tonneaux des animaux KO, leur densité globale dans la L4 n'est pas réduite comparé aux souris CX3CR1 hétérozygotes, ce qui sous-entend que l'absence de signalisation fractalkine/CX3CR1 affecte spécifiquement le recrutement des cellules microgliales aux sites de synapses en cours de maturation (Hoshiko *et al.*, 2012). Ce recrutement retardé de la microglie au niveau des synapses thalamocorticales chez les souris CX3CR1 KO est associé à une maturation fonctionnelle retardée de ces synapses. En temps normal, vers la fin de la première semaine postnatale, comme nous l'avons vu précédemment, les proportions de récepteurs glutamatergiques AMPA et NMDA aux synapses thalamocorticales évoluent dans le sens d'une augmentation du ratio AMPA/NMDA, ainsi que par le changement d'expression des sous-unités des NMDARs (Crair and Malenka, 1995 ; Lu *et al.*, 2001). Ces paramètres sont tous deux altérés chez les animaux CX3CR1 KO (**Fig. 3E, Fig. 13**). Les cellules microgliales finissent par envahir les centres des tonneaux de ces animaux au cours de la deuxième semaine postnatale et les propriétés fonctionnelles des synapses thalamocorticales rattrapent leur retard de maturation (Hoshiko *et al.*, 2012). Ces observations portent à croire que le recrutement de la microglie au niveau des synapses en maturation influence l'expression fonctionnelle des récepteurs synaptiques. L'identité du (des) véritable(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) les cellules microgliales régulent la maturation fonctionnelle des synapses thalamocorticales pendant le développement postnatal est encore inconnue. Il est intéressant de souligner qu'une altération de l'expression fonctionnelle des récepteurs AMPA et NMDA avait déjà été observée chez les souris déficientes en DAP12

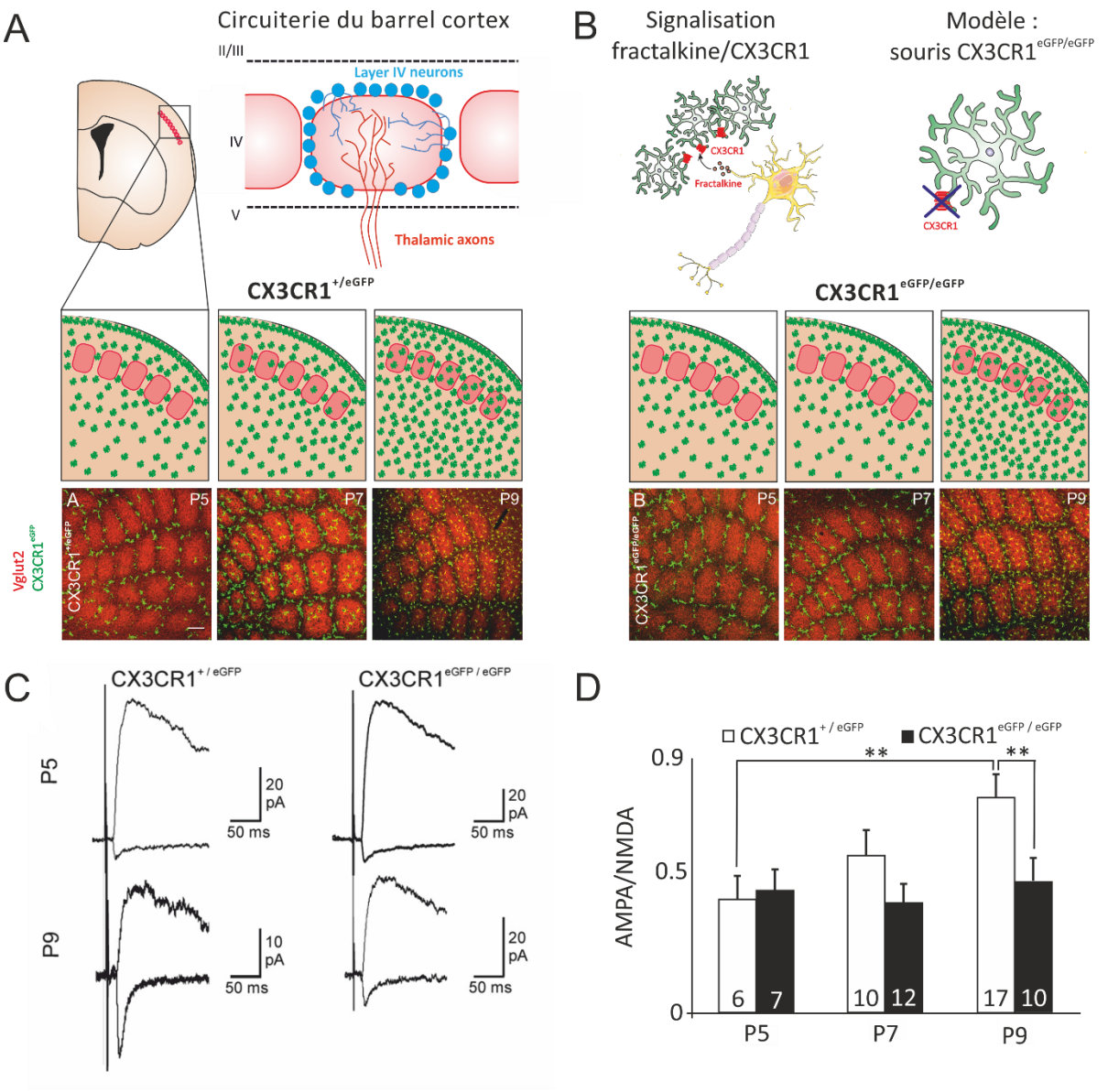


Figure 13. L'absence de la signalisation neurone-microglie fractalkine/CX3CR1 retarde le recrutement de la microglie au sein des tonneaux, causant un retard maturation fonctionnelle de la synapse thalamocorticale excitatrice. (A) Schémas de l'organisation d'un tonneau et de la distribution des cellules microgliales de la couche IV du cortex somatosensoriel primaire au cours du développement postnatal. Les immunohistochimies de sections tangentielles à travers le champ de tonneaux permettent de visualiser la microglie exprimant la GFP (en vert) et les axones thalamocorticaux (anti-5HTT, en rouge) à P5, P7 et P9 chez les souris *CX3CR1$^{eGFP/+}$* contrôles et les *CX3CR1$^{eGFP/eGFP}$* KO **(B)**. Echelle : 100 µm. B, Schéma de la signalisation fractalkine/CX3CR1 et du modèle dans lequel CX3CR1 est éliminé par knock-in. **(C)** Traces représentatives des courants soutenus par les récepteurs AMPA (courants entrants enregistrés à -70 mV) et NMDA (sortants, à +40 mV). (D) Comparaison de l'évolution des ratio AMPA/NMDA entre les première et deuxième semaine postnatales entre les *CX3CR1$^{eGFP/+}$* et les *CX3CR1$^{eGFP/eGFP}$* (Adapté de (Hoshiko *et al.*, 2012)).

(Roumier *et al.*, 2004 ; Roumier *et al.*, 2008). L'ensemble de ces observations suggère fortement qu'en plus de l'élagage synaptique, les cellules microgliales contribuent à la maturation des circuits synaptiques en exposant les neurones à des facteurs de signalisation qui régulent l'expression fonctionnelle des récepteurs glutamatergiques.

Plusieurs molécules de signalisation libérées par la microglie pourraient influencer la maturation fonctionnelle des synapses en développement (voir la partie IV.3), notamment le facteur neurotrophique BDNF, connu pour son existence dans plusieurs types cellulaires (dont la microglie) et son implication dans la régulation du développement et de la plasticité synaptique (Chao, 2003). En utilisant des souris CX3CR1^{CreERT2} pour éliminer spécifiquement le BDNF dans la microglie, le groupe de Wenbiao Gan a démontré que le BDNF microglial induisait la formation de synapses corticales (**Fig. 3C**), contrôlait l'expression des protéines synaptiques – dont les sous-unités des AMPARs et NMDARs – et influençait les performances de souris adultes pendant l'apprentissage moteur et le conditionnement à la peur (Parkhurst *et al.*, 2013). Bien que le BDNF microglial ne représente qu'une fraction infime du BDNF cérébral total, l'hypothèse sous-tend que les mécanismes dépendants de l'activité neuronal favoriseraient l'attraction des processus microgliaux vers les synapses impliquées dans une tâche d'apprentissage spécifique, permettant ainsi une libération locale du BDNF sur ces synapses ciblées. Il est donc intéressant de spéculer une implication du BDNF microglial dans la maturation fonctionnelle des synapses thalamocorticales pendant le développement du cortex somatosensoriel. La faible densité de cellules microgliales à ces stades de maturation synaptique peut cependant être en défaveur d'un rôle de la microglie par une libération locale de BDNF (mais aussi par élagage synaptique). Cependant, dans le cortex en champ de tonneaux, leur densité double en 2 jours au moment où commence la maturation fonctionnelle (Hoshiko *et al.*, 2012) et bien que leur ramification soit moins développée à cet âge (Arnoux *et al.*, 2013), elles sont dotées de la capacité de déplacer non seulement leurs prolongements mais aussi leur soma vers une source d'ATP (Arnoux and Audinat, 2015). Nous avons donc émis l'hypothèse que la libération locale de BDNF par la microglie pourrait être un mécanisme clé de la maturation excitatrice synaptique au cours du développement.

Dans la mesure où le développement coordonné de l'inhibition *feedforward* résultant de l'activation des fibres thalamiques est un élément essentiel de la maturation fonctionnelle de la circuiterie thalamocorticale (Daw *et al.*, 2007) et que la mise en place de cette inhibition est, elle aussi, régulée par le BDNF (Berghuis *et al.*, 2004 ; Itami *et al.*, 2007 ; Jiao *et al.*,

2011 ; Sun *et al.*, 2014 ; Xenos *et al.*, 2017), nous avons également émis l'hypothèse que le BDNF microglial était aussi impliqué dans le développement de ce circuit disynaptique.

Chapitre 2

Résultats

Microglial BDNF promotes the functional maturation of thalamocortical synaptic networks

Coralie-Anne Mosser[1], Sofia Baptista[1], Isabelle Arnoux[2], Etienne Audinat[1,3]

[1]Neurophysiology and New Microscopies Lab, INSERM U1128, Paris Descartes University, Paris, France.

[2]Institute of Microscopic Anatomy and Neurobiology Johannes Gutenberg, University of Mainz, Germany.

[3]IGF, CNRS, INSERM, University of Montpellier, France.

*corresponding author: etienne.audinat@igf-cnrs.fr

Présentation de l'article

Un nombre croissant d'observations a mis en lumières diverses fonctions microgliales cruciales au développement physiologique du SNC (Mosser *et al.*, 2017). Mon laboratoire a précédemment découvert que la microglie suit un profil d'invasion remarquablement stéréotypé lors de la colonisation du cortex en champ de tonneaux, et que cette entrée des cellules microgliales au centre des tonneaux où se trouvent les synapses en développement dépend de la signalisation fractalkine/CX3CR1. L'absence de cette voie de communication entre neurone et microglie retarde l'invasion des tonneaux de deux jours et de façon intéressante, est accompagnée d'un retard de maturation fonctionnelle des synapses thalamocorticales excitatrices (Hoshiko *et al.*, 2012).

La nécessité de la présence des cellules microgliales au niveau des synapses thalamocorticales en développement pour une maturation fonctionnelle adéquate a amené l'idée qu'elles contribuent à la maturation des circuits synaptiques de la couche 4 du cortex somatosensoriel primaire. Les mécanismes sous-tendant cette action microgliale sur le développement des synapses sont toutefois inconnus. Nous avons émis l'hypothèse que la microglie pourrait réguler le développement synaptique en exposant les neurones à des facteurs de signalisation libérés localement, et qui par exemple réguleraient l'expression fonctionnelle des récepteurs glutamatergiques.

En outre, les interactions entre cellules microgliales et développement des réseaux inhibiteurs sont encore largement inconnues. L'établissement des circuits inhibiteurs est pourtant indispensable à la maturation fonctionnelle de la voie thalamocorticale (Daw *et al.*, 2007). Dans cette étude, nous avons donc aussi exploré l'éventuelle contribution de la microglie à la maturation des synapses inhibitrices du cortex en champ de tonneaux.

De nombreux candidats pourraient influencer la maturation fonctionnelle des synapses en développement. Il est établi que la mise en place des connexions glutamatergiques et GABAergiques corticales est dépendante du BDNF (Berghuis *et al.*, 2014 ; Itami *et al.*, 2007). Nous avons choisi dans cette étude d'étudier spécifiquement le cas du BDNF microglial, dont le rôle dans la formation de nouvelles synapses corticales chez l'adulte a récemment été établi (Parkhurst *et al.*, 2013).

Abstract

Microglial cells, the macrophages residing in the brain, are increasingly recognized to be essential players in the physiological development of the central nervous system, particularly by establishing direct contacts with synaptic elements. However, whether microglial cells modulate the functional properties of developing cortical synapses remains unclear. We investigated here how microglial cells influence the maturation of excitatory and inhibitory synapses of the input stage of the barrel cortex. We first observed that depletion of microglia during the first postnatal week impaired the functional maturation of monosynaptic excitatory and disynaptic inhibitory responses evoked in principal neurons of layer 4 by thalamic fiber stimulation. Microglial brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has been shown previously to modulate excitatory and inhibitory synapses. We thus used *CX3CR1*^{CreERT2} mice to knockout specifically BDNF in microglia from the first postnatal week. This impaired thalamocortical excitatory and inhibitory synaptic responses during the second postnatal week in manner similar to that induced by microglia depletion. Both excitatory and inhibitory responses remained impaired in one-month-old knockout mice. Overall, our results indicate that microglial BDNF finely tunes the excitatory/inhibitory (E/I) balance in the developing neocortex. Since dysregulation of the cortical E/I balance during development has been implicated in psychiatric diseases, our study provides new insights into how microglia could contribute to these neurodevelopmental disorders.

Introduction

Microglial cells are the innate immune cells of the central nervous system (CNS) and as macrophages they have been widely studied in diseased conditions. In the last decade, they have been shown to play key roles in the developing brain (Mosser *et al.*, 2017), by promoting neuronal genesis (Shigemoto-Mogami *et al.*, 2014) and survival (Ueno *et al.*, 2013), removing dying progenitor or newly born cells (Cunningham *et al.*, 2013 ; Marín-Teva *et al.*, 2004 ; Wakselman *et al.*, 2008), regulating axonal innervation (Kitayama *et al.*, 2011 ; Pont-Lezica *et al.*, 2014 ; Squarzoni *et al.*, 2014), and also by promoting the formation of new spines (Miyamoto *et al.*, 2016 ; Parkhurst *et al.*, 2013) and by pruning synapses during phases of activity-dependent refinement of synaptic circuits (Paolicelli *et al.*, 2011 ; Schafer *et al.*, 2012). Most of these studies investigated microglia contributions to the structural development of synapses, but we also provided indirect evidence that these immune cells regulate the functional maturation of cortical excitatory synapses (Hoshiko *et al.*, 2012). During the first postnatal week, microglial cells are recruited at sites of maturating synapses in the mouse somatosensory barrel cortex by a mechanism involving the neuronal chemokine fractalkine and its microglial receptor CX3CR1. Deficiency in CX3CR1 delays microglia recruitment at maturating thalamocortical synapses and delays the functional maturation of postsynaptic glutamate receptors at these excitatory synapses (Hoshiko *et al.*, 2012). It was not clear, however, whether the latter effect was a consequence of the former one.

Besides the increasingly investigated interactions between microglia and developing excitatory synapses, little is known on the role of these immune cells on the maturation of inhibitory synapses**.** Yet, in the adult CNS chronic and acute mobilization of microglia regulates the activity of inhibitory synapses (Cantaut-Belarif *et al.*, 2017 ; Chen *et al.*, 2014 ; Coull *et al.*, 2005). Moreover, perturbations of microglia during embryonic development affect the laminar distribution of inhibitory interneurons in the neocortex (Squarzoni *et al.*, 2014). Microglial cells are thus interacting with inhibitory neurons and could therefore influence the maturation of inhibitory synapses during development.

The aim of the present study was thus to investigate whether and how microglial cells influence the functional development of excitatory and inhibitory synapses in the somatosensory cortex. In the barrel field of the cortex, ascending sensory input from the whisker pad enters the neocortical layer 4 through the lemniscal pathway (Petersen, 2007). The first barrel-like structures emerge at postnatal day 4 (P4) from the convergence of

thalamocortical (TC) axons conveying information from a single whisker to layer 4. TC axons then contact dendrites of layer 4 principal neurons (including mostly spiny stellate cells and some pyramidal and star pyramidal cells (Brecht and Sakmann, 2002 ; Staiger, 2004) whose somas translocate around P5 to the periphery of barrels. In parallel, a substantial increase in synaptic density occurs at TC synapses, with the modification in glutamatergic AMPA and NMDA receptors expression, leading to an increase in the AMPA/NMDA ratio (Inan and Crair, 2007 ; Lu *et al.*, 2001). This is followed by thalamic recruitment of strong feedforward inhibition (Cruikshank *et al.*, 2007). This latter is predominantly mediated by parvalbumin (PV)-expressing interneurons and regulates information processing in layer 4 by controlling spatial and temporal integration windows of thalamic inputs (Gabernet *et al.*, 2005). The appropriate development of feedforward inhibition in layer 4 is consequently imperative for proper sensory processing.

To assess whether the presence of microglia is necessary for the proper maturation of thalamocortical circuits, we first explored the consequences of microglia depletion at early postnatal days by intracerebral injections of cliposome-encapsulated clodronate. The absence of microglial cells affected the development of monosynaptic excitatory and disynaptic feedforward inhibitory synapses on layer 4 principal cells, indicating that the appropriate maturation of thalamocortical circuits requires microglia colonization of the barrel cortex during the first postnatal week. Considering previously demonstrated effects of microglial brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on synaptogenesis in adult mice (Parkhurst *et al.*, 2013), we tested whether this growth factor was responsible for the effects of microglia on the maturation of thalamocortical circuits. Using $CX3CR1^{CreER/+}::BDNF^{lox/lox}$ mice, we show that early knock out of microglial BDNF impairs both excitatory and inhibitory responses of layer 4 neurons to thalamic stimulations during the second postnatal week and has long-term consequences on the functional properties of thalamocortical excitatory and inhibitory pathways that can be observed in one-month-old mice.

Experimental procedures

Mice

All experiments followed guidelines of the European Union for the care and use of laboratory animals (Council directive 86/609EC) and were approved by the ethics committee of the University of Paris Descartes (registered numbers CEEA34.EA.027.11 and CEEA16-032). Experiments were performed on $CX3CR1^{eGFP/+}$ mice of either sex, obtained by crossing

CX3CR1$^{eGFP/eGFP}$ (Jung et al., 2000) with wild-type C57BL/6J mice (Janvier). Conditional knockout of BDNF in microglia was obtained using *CX3CR1*^{CreER} (Yona et al., 2013) and *BDNF*^{flox} (Rios *et al.*, 2001) mice. Specifically, we crossed *CX3CR1*$^{CreER/CreER}$*::BDNF*$^{lox/+}$ mice with *CX3CR1*$^{+/+}$*::BDNF*$^{lox/+}$ to obtain *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{+/+}$ (wildtype) or *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{lox/lox}$ (microglia BDNF knockout) littermates. To assess the efficiency of recombination, *CX3CR1*$^{CreER/CreER}$ were crossed with *Rosa26*$^{floxSTOP\text{-}YFP}$ and heterozygous P8 mice were used for immunohistochemistry. All transgenic mice were maintained on a C57/Bl6 background.

Immunostainings

CX3CR1$^{eGFP/+}$ and *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::Rosa26*$^{lox/+}$ were anesthetized and perfused transcardially first with phosphate buffer saline (PBS) then with 0.15 M phosphate buffer (PB), pH 7.4 containing 4% paraformaldehyde (PFA). Brain were removed and kept overnight in 4% PFA at 4°C for fixation. After several washes in PBS, fifty-micrometer-thick coronal sections were preincubated for 1 h 30 at room temperature (RT) in PBS containing 4% Normal Goat Serum (NGS) (Sigma-Aldrich) and 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and then for 48 h at 4°C with primary antibodies diluted in a 0.2% triton X-100 solution and 2% NGS. The following primary antibodies were used: the anti-EYFP (1:500, chicken polyclonal, Invitrogen), the microglia-specific marker Iba1 (1:1000, rabbit polyclonal, Wako Chemicals), the glutamate vesicular transporter guinea pig anti-VGluT2 (1:500, guinea pig polyclonal, Milipore), the astrocytic marker anti-glutamine synthetase (1:500, mouse polyclonal, Milipore), the neuronal marker anti-NeuN (1:1000, guinea pig polyclonal, Milipore). After washing, sections were incubated for 2 h at RT with secondary antibodies Alexa Fluor405 (anti-mouse IgG 1:250, Invitrogen), Alexa488 (anti-chicken IgG 1:250, Invitrogen), Alexa Fluor546 (anti-rabbit IgG 1:250; Invitrogen), Alexa Fluor633 (anti-guinea pig IgG 1:250; Invitrogen), for 2 or 2.5 h in dark at room temperature. Sections were rinsed in PBS and mounted in Vectashield (Vector Laboratories) or Fluoromount-G (SouthernBiotech) for confocal microscopy (Zeiss LSM-710). Images were analyzed in ImageJ (NIH). Z-projections from multiple imaging planes were generated. Microglia cell bodies were counted using Cell Counter ImageJ plugin. Colocalisation was determined by using Colocalisation Threshold method in ImageJ.

***In vivo* manipulations**

For microglia depletion, unilateral intracerebral injections were performed on *CX3CR1*$^{eGFP/+}$ neonates at P3 and P5 briefly anesthetized by hypothermia. Two µl of a solution containing

liposome-encapsulated clodronate (http://clodronateliposomes.org) or PBS-containing liposomes (vehicle) was slowly administered using a 25-gauge Hamilton syringe in the primary motor cortex. The time during which pups were separated from the dam for this procedure never exceeded 30 minutes. Depletion efficiency was assessed by immunohistochemistry at P8 and at P11. Control mice showed no detectable phenotype.

To knock out BDNF in microglia, Cre expression was induced in control *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{+/+}$ and littermates *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{lox/lox}$ mice by daily intraperitoneal injections of 0.2 mg of 4-hydroxytamoxifen (Tocris Bio-science) as a solution in filtered corn oil from P3 to P5. Mice were analyzed starting at P7. To assess the recombination percentage, we performed similar 4-hydroxytamoxifen injections in *CX3CR1*$^{+/CreER}$*::Rosa26*$^{lox/+}$ and P8 mice were used for immunohistochemistry.

Electrophysiology

***Slice preparation*.** Mice aged between 7 and 12 days or 30 and 35 days were anesthetized with isoflurane, decapitated and brains were gently and rapidly removed from the skull. Thalamocortical slices were cut using the method described by (Agmon and Connors, 1991) with a Leica VT1200 vibratome in an oxygenated (5% CO2 and 95% O2) ice-cold protective extracellular solution containing (in mM) for young animals (P7-12): 215 sucrose, 2.5 KCl, 1.3 NaH_2PO_4, 25.9 $NaHCO_3$, 20 D-glucose, 5 sodium pyruvate, 7 $MgCl_2$, and 1 $CaCl_2$ (pH 7.3, 320 mOsm); and for older animals (P30-35): 93 NMDG, 2.5 KCl, 1.2 NaH_2PO_4, 30 $NaHCO_3$, 20 HEPES, 2 thiourea, 25 D-glucose, 5 sodium ascorbate, 3 sodium pyruvate, 10 $MgCl_2$, and 0.5 $CaCl_2$ (pH 7.3, 315 mOsm). After cutting, slices of young animals were incubated for 30 min at 34°C in regular artificial cerebro-spinal fluid (aCSF; pH 7.3, 310 mOsm) containing (in mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 26 $NaHCO_3$, 1.25 NaH_2PO_4, 20 mM D-glucose, 1 sodium pyruvate, 1 $MgCl_2$, and 2 $CaCl_2$. For older animals, slices were first incubated in the same protective NMDG-containing extracellular solution for 7 min at 34°C and then incubated at 34°C for 30 min in regular aCSF. The slices were then maintained at room temperature (RT, 23-24°C) for 0.5–5h oxygenated aCSF until the recordings. After the incubation, individual slices selected for best visibility of barrels in cortical layer 4 and presence of thalamocortical fibers were transferred to a recording chamber perfused with the same aCSF at 5 ml/min at RT, except for experiments aiming at analyzing thalamocortical feedforward inhibition that were performed at 33°C.

Recordings, data acquisition and analysis. Layer 4 neurons were visualized using infrared

differential interference contrast microscopy. Whole-cell patch-clamp recordings were performed from layer 4 principal neurons and feedforward interneurons in current- and voltage-clamp mode. For voltage-clamp recordings pipettes (3-5 MΩ) contained (in mM): 125 CsMeSO3, 10 HEPES, 10 EGTA, 8 TEA-Cl, 5 4-AP, 0.4 GTP-Na, 4 ATP-Na_2, 1 $CaCl_2$ and 1 $MgCl_2$ (pH 7.3, 290 mOsm). For current-clamp recordings and voltage-clamp responses evoked in interneurons, pipettes (3-5 MΩ) were filled with a solution containing in mM: 130 K-Gluconate, 2 $MgCl_2$, 10 HEPES, 0.4 Na+-GTP, 4 ATP-Na_2, 10 Phosphocreatine disodium salt, 5 KCl, 0.5 EGTA (pH 7.3, 290 mOsm). Neurobiotin was included in the intracellular solution of some experiments to assess the typical morphology of layer 4 multipolar spiny stellate cells with high density of dendritic spines or feedforward interneurons with round soma, aspiny dendrites and arborization confined within one barrel most of the time. Recordings were performed using an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices). Currents were low-pass filtered at 5 kHz, collected at a 10 kHz frequency, and analyzed off-line using PClamp 10 (Molecular Devices) for voltage-clamp recordings, or using a custom written procedure in IGOR Pro 6.0 (Wavemetrics) for current-clamp recordings. All potentials were corrected for a junction potential of -10 mV. Series resistances (R_s) were not compensated but continuously monitored using a 10 mV hyperpolarizing pulse at the beginning of each sweep. Recordings were discarded if R_s increased by >20% during the whole experiment. Thalamocortical EPSCs and IPSCs were evoked at a frequency of 0.05 Hz using a stainless steel bipolar microelectrode (100 µm tip diameter, 250 µm intertip distance; Rhodes Medical Instruments) connected to a stimulus isolation unit (Iso-stim 01D; npi Electronic) and placed in the ventrobasal thalamus or in the internal capsule near the thalamus border. For AMPA/NMDA ratio measurements, the intensity of stimulation (0.1 ms at 0.05 Hz) was adjusted according to the protocol of minimal stimulation described in (Hoshiko et al., 2012). To evaluate the extent that thalamic stimulation recruits disynaptic feedforward inhibition onto stellate cells, we calculated the ratio of the peak amplitude of the $GABA_A$ receptor–mediated IPSC measured at 0 mV to the peak amplitude of the AMPA receptor–mediated EPSC measured at −70 mV, which we refer to as the $GABA_A$/AMPA ratio. The intensity of stimulation was first adjusted according the protocol of minimal stimulation (Hoshiko et al., 2012) and then increased 1.5 times to ensure that we could recruit feedforward inhibition if it was present. If with the increased stimulation level we did not observe an inhibitory response at 0 mV, we recorded both responses at the minimal stimulation. The amplitude and time constants of EPSCs and IPSCs were quantified from the average of 15–30 consecutive responses. The membrane capacitance (C in pF) was estimated by fitting the exponential

decay of the current in response to the hyperpolarizing pulse and using the following equation: $C = (\tau(R_m+R_s))/((R_m*R_s))$, with τ being the weighted tau and measured as $\tau = (A_1*\tau_1+A_2*\tau_2)/(A_1+A_2)$, R_m and R_s being the membrane and series resistances, respectively. To determine the paired-pulse ratio of TC EPSCs in feedforward interneurons, 50 Hz paired stimulations were evoked at -70 mV and the ratio of the second over the first EPSC was measured on the averaged response. In current clamp, to characterize basic membrane properties, a series of hyperpolarizing and depolarizing current steps were applied for 1 s in 25-50 pA increments at 5 s intervals. The action potential threshold was determined for the first spike at the lowest level of depolarizing current required to evoke at least one spike. Measurements of action potential parameters were performed on the first action potential on the first sweep to reach the threshold. Experiments to measure the AMPA/NMDA ratio were performed in presence of the antagonist of $GABA_A$ receptors gabazine (SR 95531 hydrobromide, 10 µM, Tocris). NMDA-R-mediated component of the evoked EPSC was recorded with AMPA-R antagonist 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide disodium salt (NBQX; 10 µM, Tocris or Hellobio) bath-applied.

Statistics

Data were analyzed and plotted using GraphPad Prism. Comparison of two groups of data was carried out with two-tailed unpaired Mann-Whitney test or Kolmogorov-Smirnov test to compare data distributions. To test statistical significance in between more than two groups of data, we used Kruskal Wallis test or Sidak's multiple comparisons test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical data are showed as mean ± SEM or whisker box plots (shoulders of the boxes indicate 25–75% intervals, whiskers indicate min to max, median line of the data is presented within the box, and mean is depicted by the red or blue bar). All graphs are made with CorelDRAW. Throughout the text n refers to the number of cells and N to the number of animals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Results

Early microglia depletion impairs functional maturation of thalamocortical excitatory and inhibitory pathways

Using the constitutive CX3CR1 knock-out model, we previously showed a correlation between the recruitment of microglia at sites of maturating thalamocortical synapses (*i.e.* the barrel centers) at the end of the first postnatal week and the functional maturation of these

synapses (Hoshiko *et al.*, 2012). To test directly that the presence of microglia influences the maturation of functional properties of thalamocortical synapses, we depleted microglial cells during early postnatal development by injecting liposomes containing the toxin clodronate, or PBS as control, in the primary motor cortex at P3 and P5, of *CX3CR1*$^{eGFP/+}$ mice (**Fig. I.1A**). Liposomes are phagocytosed by microglial cells that rapidly die by clodronate-induced apoptosis (Buiting and Rooijen, 1994), leading to a depletion of 50 to 80% of microglial cells in the somatosensory cortex at P8 (**Fig. I.1B and Fig. I.1D**). Repopulation of cortical layers occurred slowly, and depletion was still significant at P10-11 (**Fig. I.1C and Fig. I.1E**). Using GFAP immunostaining, we did not observe astrogliosis in the cortex at P8 after injections of clodronate-liposomes (data not shown). To examine how microglial cells influence the establishment of thalamocortical networks required for the integration of sensory signals from the whiskers, we recorded postsynaptic currents evoked in layer 4 principal excitatory cells by minimal stimulation of thalamocortical afferents (**Fig. I.2A**, see Experimental Procedures).

The peak amplitude of the fast AMPAR-mediated and of the slow NMDAR-mediated components of the EPSCs was measured at holding potentials of -70mV and +40 mV, respectively. The proportion of glutamate AMPA and NMDA receptors at these synapses changes over the first postnatal week, leading to an increase of the AMPA/NMDA ratio (2001) (Inan and Crair, 2007). We found that the AMPA/NMDA ratio at P9-12 was significantly lower in clodronate-treated mice than in PBS-treated animals (**Fig. I.2**). This observation is in keeping with our previous results obtained with CX3CR1 knockout mice (Hoshiko *et al.*, 2012) and indicates that the presence of microglia in the barrel cortex promotes the maturation excitatory thalamocortical synapses onto principal neurons. We then investigated whether depleting microglia also perturbed the development of thalamocortical feedforward inhibition (**Fig. I.2D**). Fast-spiking GABAergic interneurons, which are the main contributors of this disynaptic circuits, are present in layer 4 by P3 but are not recruited by thalamocortical stimulation, and thus not integrated into the network, before the second postnatal week (Daw *et al.*, 2007). We confirmed this relatively late development of feedforward inhibition by quantifying the $GABA_A$/AMPA ratio (see Experimental Procedures) of thalamocortical responses in principal neurons (**Suppl. Fig. I.1**). In the barrel cortex of microglia-depleted animals, we observed an impaired development of $GABA_A$/AMPA ratio at P9-12, which remained low compared to that of PBS-treated animals (**Fig. I.2E-F**), with values comparable to that of one-week old animals (see **Suppl. Fig. I.S.1**).

Notably, half of the cells (n=10/19) from microglia-depleted mice at P9-12 did not receive a feedforward IPSC ($GABA_A$/AMPA ratio = 0; see **Fig. I.2F**), a phenomenon that was rarely observed in control mice at this age (n=1/13). Overall, our results demonstrate that the presence of microglial cells is required for the appropriate maturation of thalamocortical circuits.

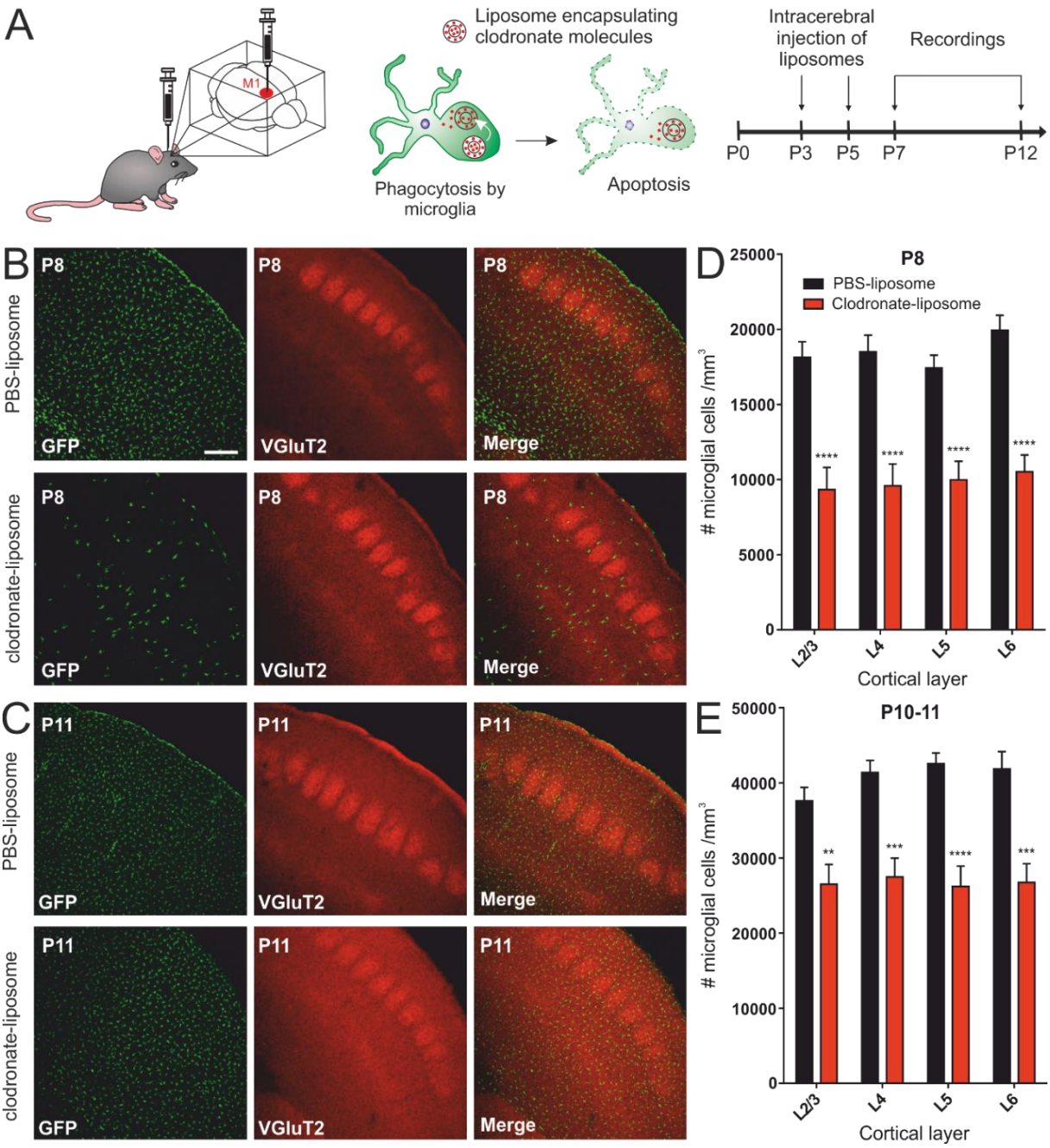


Figure I.1. **Early microglia depletion using liposome-encapsulated clodronate. A**, Schematic representation of the strategy to deplete microglia using clodronate-liposome. Liposomes containing clodronate or PBS were injected in the primary motor cortex (M1) of pups at P3 and P5. After injection, liposomes are ingested and digested by microglial cells, and the intracellular release of clodronate induces apoptosis in these cells. Electrophysiological recordings were performed between

P7 to P12. **B**, **C**, Confocal images of coronal sections showing the thalamocortical axons (red, anti-VGlut2) and the fluorescent microglia (green) of the barrel cortex of P8 (B) and P11 (C) *CX3CR1*$^{eGFP/+}$ littermates injected with PBS-liposomes (upper row) or with clodronate-liposomes (lower row). Scale bar: 200 µm. **D**, Comparison of microglial cell density in P8 PBS-liposome-injected (black) and clodronate-liposome-injected (red) mice ($F(1, 52) = 30.06$, $p < 0.0001$, PBS-liposomes: 34 slices, 4 N =, clodronate-liposome: 20 slices, 4 N =, Sidak's multiple comparisons test). E, Same as D at P10-11 ($F(1, 27) = 20.42$, $p = 0.0001$, PBS-liposomes: 13 slices, N = 5, clodronate-liposome: 17 slices, N = 7, Sidak's multiple comparisons test).

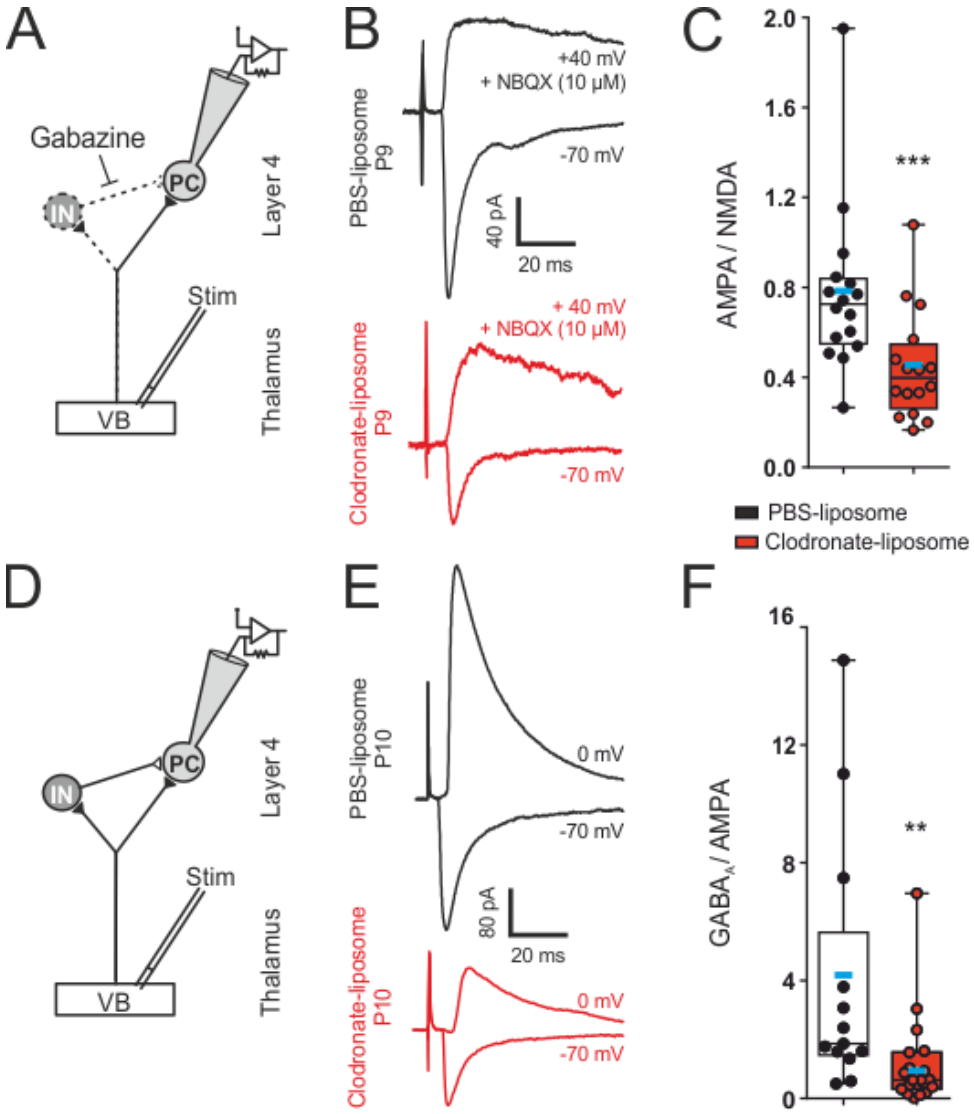


Figure I.2. Microglia depletion impairs the functional maturation of monosynaptic excitatory and disynaptic feedforward inhibitory thalamocortical pathways. A, Scheme of the recording configuration. The stimulating electrode is placed on the ventrobasal thalamus (VB) to activate thalamocortical fibers and elicit a monosynaptic excitatory response in layer 4 principal cells (PC). **B**, Voltage-clamp recordings of AMPAR- and NMDAR-mediated thalamocortical EPSCs (average of 15 traces) from layer 4 neurons of P9 mice injected with PBS- (black) or clodronate-(red) liposomes. **C**, Box-and-whisker/scatter plots of the AMPA/NMDA ratios at P9-11 for clodronate- and PBS-

liposome-treated *CX3CR1*$^{eGFP/+}$ littermates (Two-tailed Mann-Whitney U, p = 0.0009, PBS-liposome: N = 4, n = 16, median = 0.7257; Clodronate-liposome: N = 5, n = 16, median = 0.3978). **D**, Scheme of the recording configuration to elicit a monosynaptic excitatory response and disynaptic feedforward inhibition in layer 4 principal neurons (IN: interneuron). **E**, Thalamocortical-evoked EPSC (at -70mV) and IPSC (at 0mV) in layer 4 neurons from P10 PBS- (black) and P9 clodronate- (red) liposome-injected mice (average traces from at 20 sweeps). **F**, Box-and-whisker/scatter plots of the $GABA_A$/AMPA ratios at P9-11 for clodronate- and PBS-liposome-treated *CX3CR1*$^{eGFP/+}$ littermates (Two-tailed Mann-Whitney U, p = 0.002, PBS-liposome: N = 5, n = 13 cells, median = 1.86; Clodronate-liposome: N = 8, n = 19, median = 0.63).

Microglial BDNF is required for the functional maturation of thalamocortical excitatory and inhibitory synapses

We next wondered how microglial cells could exert this effect leading to the proper maturation of excitatory and inhibitory circuitry. A plausible hypothesis was that microglial cells invading the barrels locally release some messengers necessary for synaptic maturation. The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has been identified as a key modulator for maturation of dendritic arborizations and spine density maintenance in the barrel cortex (Sun *et al.*, 2014) and during the last decade, several studies have proposed that microglial cells control synaptic activity, neuronal excitability and spine formation through the release of BDNF (Coull *et al.*, 2005 ; Parkhurst *et al.*, 2013 ; Trang *et al.*, 2009 ; Ulmann *et al.*, 2008). We therefore produced *CX3CR1*$^{CreER/+}$*:BDNF*$^{lox/lox}$ mice (and *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{+/+}$ as controls, see Experimental Procedures) to knockout BDNF in microglia. Recombination was selectively induced in microglia by tamoxifen injections from P3 (**Fig. I.3A-E**). Testing monosynaptic excitatory responses at P10-12 showed that the AMPA/NMDA ratio was lower in microglial BDNF knockout mice than in wildtype littermates (**Fig. I.2F-G**), with values comparable to those of P5-7 wildtype animals (Hoshiko *et al.*, 2012). Interestingly, feedforward inhibition was also impaired in microglia BDNF knockout mice (**Fig. I.3F-G**), with values of $GABA_A$/AMPA ratio near those of one-week old animals (**Suppl. Fig. I.S.1**), and several cells (n=6/17) with a null ratio, *i.e.* no evoked IPSC. This strongly suggests that BDNF is one of microglial mediators influencing the functional maturation of thalamocortical synaptic networks in the barrel cortex.

Long term consequences of early postnatal manipulation of microglia on functional properties of thalamocortical pathways

We next studied whether functional deficits induced by early microglia manipulation (*i.e.* depletion or BDNF knockout) were lasting through adulthood. We recorded thalamocortical

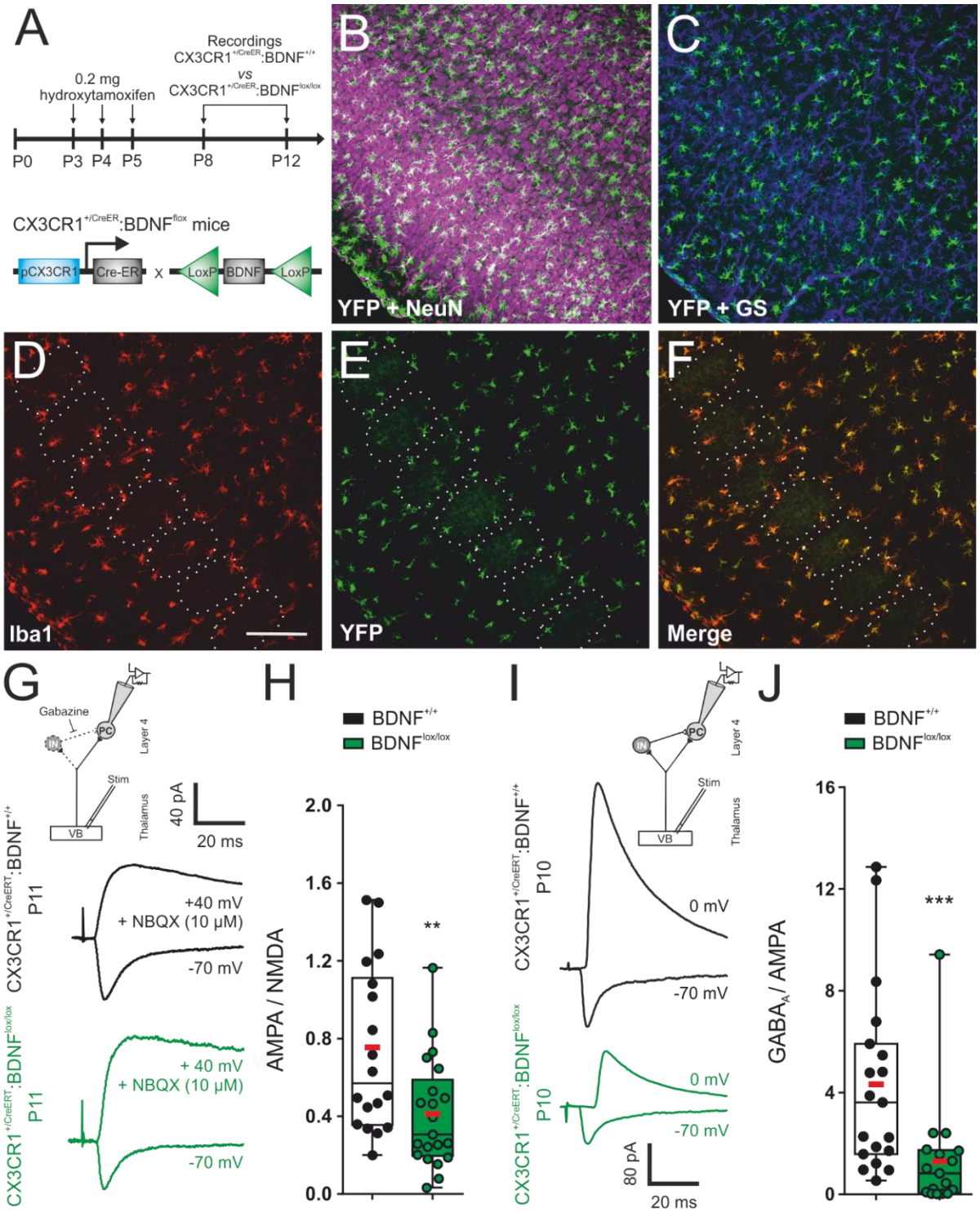


Figure I.3. **BDNF deficiency in microglia impairs the functional maturation of thalamocortical excitatory and feedforward inhibitory pathways onto layer 4 principal neurons. A,** Genetic strategy to deplete selectively BDNF in microglia. Cre-mediated recombination only occurs in cells expressing CX3CR1, *e.g.* microglial cells. Right panel: timeline of the protocol for the induction of Cre expression. Three consecutive intraperitoneal injections of 0,2 mg hydroxytamoxifen were administered at P3, P4 and P5. Electrophysiological were performed 3 to 7 days after the last injection. **B, C**, Merge confocal images of coronal sections through layer 4 showing Cre-driven-YFP expression in microglia (green, anti-GFP) and neuron (C, red, anti-NeuN) or astrocytes (D, blue, anti-GS) of the

barrel field. **D-F**, Confocal images of coronal sections through layer 4 showing microglia labelled by Iba1 (red, anti-Iba1, D) and Cre-driven-YFP expression (green, anti-GFP, E) of the barrel field of P8 *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::RosaYFP*$^{lox/+}$ mice. The merge image in F illustrates the selectivity of the transgene expression in Iba1 positive microglia. We verified that there was no expression of YFP in mice non-injected with hydroxytamoxifen (data not shown). Scale bar: 200 µm. **G**, Voltage-clamp recordings of AMPAR- and NMDAR-mediated thalamocortical EPSCs (average of 20 traces) from layer 4 neurons of P11 *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{+/+}$ (black) and P11 *CX3CR1*$^{CreER/+}$::BDNF$^{lox/lox}$ (green) mice. Inset on the left: scheme of the recording configuration. **H**, Box-and-whisker/scatter plots of the AMPA/NMDA ratios at P9-11 for *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{+/+}$ and *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{lox/lox}$ littermates (Two-tailed Mann-Whitney U, p = 0.008, *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{+/+}$: N = 8, n = 18, median = 0.57; *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{lox/lox}$: N = 10, n = 21, median = 0.31). **I**, Thalamocortical-evoked EPSC at -70 mV and thalamocortical-evoked IPSCs at 0mV (average traces from 20 sweeps) in layer 4 neurons of *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{+/+}$ (black) and P10 *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{lox/lox}$ (green) mice. Inset on the left: scheme of the recording configuration. **J**, Box-and-whisker/scatter plots of the $GABA_A$/AMPA peak amplitude ratios at P9-11 for *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{+/+}$and *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{lox/lox}$ littermates (Two-tailed Mann-Whitney U, p = 0.0008, *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{+/+}$: N = 7, n = 19, median = 3.61; *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{lox/lox}$: N = 7, n = 17, median = 0.83).

EPSCs evoked in layer 4 principal cells in young adult mice at P30-35. Surprisingly, we found that the AMPA/NMDA ratio at thalamocortical monosynaptic connections strongly decreased at this stage of development in our two groups of control wildtype mice, *i.e.* *CX3CR1*$^{eGFP/+}$ treated with PBS-liposomes and *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{+/+}$animals compared to P10-12 (**Suppl. Fig. I.S.2A**). To our knowledge, this has never been reported in the literature. We therefore performed additional recordings in thalamocortical slices of P30 wildtype mice purchased from Janvier to verify that this synaptic property did not depend on our breeding strategy or housing conditions. We observed that values of AMPA/NMDA ratio did not differ in these new wildtype mice compared to the two other control groups of animals (**Suppl. Fig. I.S.2B**), demonstrating that the proportion of AMPA and NMDA receptors reverses again after the closure of the critical period (Bannister, 2005 ; Lu *et al.*, 2001). Microglia depletion at early stages induces a default of maturation at the end of the first postnatal week (**Fig. I.2**). However, when we tested these animals at P30-35 we observed that the AMPA/NMDA ratio of thalamocortical excitatory responses did not differ from that of control mice (**Fig I.4**), suggesting that transient microglial depletion followed by repopulation only delays the maturation of the thalamocortical network (but see discussion).

In marked contrast, knocking out BDNF in microglia from P3-P5 induced long lasting impairment of thalamocortical monosynaptic excitation, with AMPA/NMDA ratios higher than those of control littermates (**Fig. I.4**). Of note, the AMPA/NMDA ratio of microglia

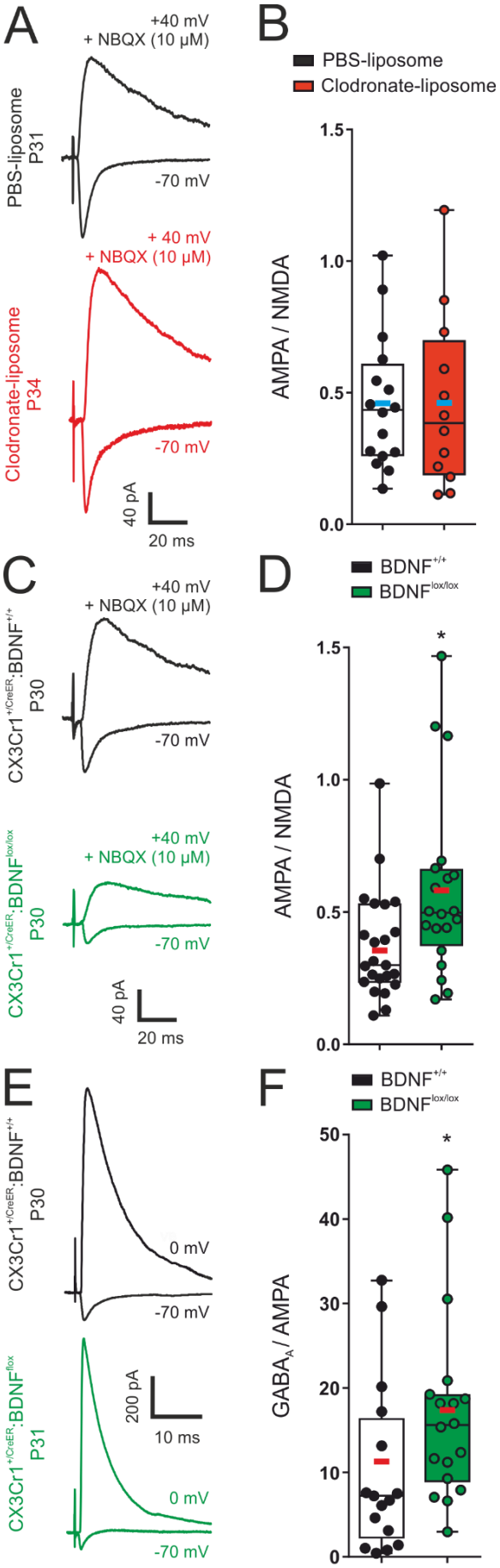


Figure I.4. Long term effects of early microglia manipulations. A, C, Average traces of AMPAR- and NMDAR-mediated thalamocortical EPSCs from layer 4 neurons of A, P31 PBS-liposome-injected (black) and P34 clodronate-liposome-injected (red) mice, and C, P31 *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{+/+}$ (black) and P34 *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{lox/lox}$ (green) mice. **B, D**, AMPA/NMDA ratio at P30-35 of A, clodronate-liposome-treated and PBS-liposome-treated *CX3CR1*$^{+/eGFP}$ mice (Two-tailed Mann-Whitney U, p = 0.68, PBS-liposome: N = 10, n = 16, median = 0.43; Clodronate-liposome: N = 5, n = 12, median = 0.38) and **D**, *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{+/+}$ and *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{lox/lox}$ mice (Two-tailed Mann-Whitney Whitney U, p = 0.016, *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{+/+}$: N = 12, n = cells, median = 0.29; *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{lox/lox}$: N = 10, n = 20, median = 0.50). **E**, Average traces of a thalamocortical EPSC at -70 mV and a thalamocortical-evoked IPSCs at 0mV in layer 4 neurons of P30 *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{+/+}$ (black) and P31 *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{lox/lox}$ (green) mice. **F**, $GABA_A$/AMPA ratio at P30-35 between *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{+/+}$ and *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{lox/lox}$ mice (Two-tailed Mann-Whitney Whitney U, p = 0.025, *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{+/+}$: N = 5, n = 16, median = 6.97; *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{lox/lox}$: N = 6, n =

BDNF knockout mice did not differ between P9-12 and P30-35 animals (Mann-Whitney U test, p=0.11) Thus, in wildtype animals the AMPA/NMDA ratio starts low to increase between P5 and P10-12 and decreases again before the end of the first postnatal month, whereas in microglia BDNF knockout mice the AMPA/NMDA ratio remains low throughout development. Disynaptic feedforward inhibition was also impaired in microglia BDNF knockout mice at P30-35 (**Fig. I.4E-F**). However, the $GABA_A$/AMPA ratio was higher than in wildtype littermates (**Fig. I.4**) whereas it was lower at P9-12 (**Fig. I.3**), suggesting the occurrence of compensatory mechanisms in the feedforward inhibition pathway after P12 in the absence of microglial BDNF.

Discussion

Our data indicate that reciprocal interactions between neurons and microglial cells control thefunctional maturation of the thalamocortical network, and that BDNF is one of the microglial mediators influencing the functional maturation of both excitatory and inhibitory thalamocortical synapses.

Microglia presence at thalamocortical synapses is required at the end of the first postnatal week

We previously showed that the recruitment of microglia and the maturation of thalamocortical excitatory synapses in the barrel centers are delayed in CX3CR1 knockout mice (Hoshiko *et al.*). Together with observations showing that microglial cells from CX3CR1 knockout mice have a slower chimiotaxism (Arnoux and Audinat, 2015 ; Liang *et al.*, 2009), this correlation suggested that the recruitment of microglia at developing thalamocortical synapses is regulated by fractalkine signaling and is necessary for the timely maturation of these synapses. However, other characteristics of CX3CR1 knockout microglia than a slower recruitment could have also an impact on the maturation of synapses (*e.g.* higher IL-1β production; see (Rogers *et al.*, 2011). We therefore aimed at testing more directly a possible causal relationship between the presence of microglia in the barrel centers and the maturation of thalamocortical synapses. Depletion experiments with clodronate-liposomes during the first postnatal week clearly support the existence of such a link. As with other approaches (Elmore *et al.*, 2014 ; Squarzoni *et al.*, 2014), the depletion was only transient but the repopulation was relatively slow, allowing us to test the maturation state of thalamocortical synapses during the second postnatal week, before the full re-colonization of the barrels, which in our experimental setting occurs around P14 (not shown but see (Nelson and Lenz, 2017 ;

VanRyzin *et al.*, 2016). We observed that both the monosynaptic excitatory and the disynaptic inhibitory pathways were under-developed in the absence of microglia, indicating that the presence of these immune cells is required for the normal development of thalamocortical synaptic circuits.

Developmental evolution of thalamocortical excitatory synapse properties

In the case of the direct excitatory connection, we also wanted to test whether this impairment was transient and thus whether AMPA/NMDA ratio would reach control levels upon repopulation of the barrels by microglia. Surprisingly, however, the AMPA/NMDA ratio of thalamocortical synapses of all groups of adult control animals was lower than that observed at P9-12 during normal development. Thus, the normal development of the AMPA/NMDA ratio follows a bell-shaped curve, with low values during the first postnatal week and during adulthood, and a peak during the second postnatal week (Hoshiko *et al.*, 2012 ; Lu *et al.*, 2001). To our knowledge, there is no other study reporting on the value of AMPA/NMDA ratio at this synapse at P30 or more. The oldest stage explored in previous studies is P21 with AMPA/NMDA ratio that did not differ from that of the second postnatal week (Chung *et al.*, 2017 ; Harlow *et al.*, 2010). Thus, the transition toward lower values would occur after weaning and further studies are needed to explore whether this change corresponds to a re-opening of the critical window for LTP induction (Isaac *et al.*, 1997). Regarding the development of the AMPA/NMDA ratio after a transient postnatal depletion of microglia, we observed low values that did not differ from those of control animals. Further experiments during the third postnatal week are therefore needed to test whether the late arrival of microglial cells after depletion induces a peak in AMPA/NMDA ratio before the decrease occurring after weaning or whether the ratio remains low throughout development despite microglia repopulation. In any case, it is worth noting that early postnatal microglia depletion with clodronate liposomes has been shown to have long term effects on the behavior of adult rats (Nelson and Lenz, 2017 ; VanRyzin *et al.*, 2016).

BDNF released from microglia is required for the maturation of thalamocortical networks

Our results with microglial BDNF knockout mice strongly suggest that this growth factor is a critical microglial mediator contributing to the development of thalamocortical circuits. BDNF was known to regulate the development of thalamocortical synapses (Itami *et al.*, 2003

; Yamamoto and Hanamura, 2005) and of cortical inhibitory circuits (Berghuis *et al.*, 2004 ; Huang *et al.*, 1999 ; Itami *et al.*, 2007 ; Jiao *et al.*, 2011 ; Marty *et al.*, 1997 ; Sun *et al.*, 2014 ; Xenos *et al.*, 2017). Although microglial cells had never been proposed as the source of BDNF that promotes the maturation of cortical synapses during early postnatal development, microglial BDNF is known to regulate the polarity of GABAergic synaptic transmission in the spinal cord in models of neuropathic pain (Coull *et al.*, 2005 ; Hildebrand *et al.*, 2016 ; Ulmann *et al.*, 2008) and to favour the formation of new spines in the cortex during motor learning task (Parkhurst *et al.*, 2013). Controversy regarding the expression of BDNF by microglia arose though from recent transcriptome analysis that failed to detect BDNF mRNAs from purified microglial cells (Bennett *et al.*, 2016 ; Butovsky *et al.*, 2014 ; E. Hirbec *et al.*, 2017 ; Hickman *et al.*, 2013). An explanation for this discrepancy between transcriptomics and functional analyses could be that the process through which microglial cells are purified changes the expression level of some mRNAs and thus would prevent the detection of BDNF mRNAs, which are certainly at low level. In line with this hypothesis, RiboTag strategy to analyze the translatome of microglia clearly showed that isolation of microglial cells changes their expression profile (Haimon *et al.*, 2018 ; Kang *et al.*, 2017) and preliminary data arising from one of these studies indicates a low level of BDNF expression in microglia in different physiopathological conditions (Kang *et al.*, 2017; see https://microglia.shinyapps.io/Shiny_RiboTag/). Alternatively, a possible drawback of our analysis could be a lack of specificity of the Cre/lox approach. However, in line with a recent study of these mice (Haimon *et al.*, 2018), the control experiments performed on $CX3CR1^{CreER/+}::Rosa26^{lox/+}$ mice did show a high specificity of the reporter expression in microglia. Moreover, the phenotype that we observed in these knockout mice for microglial BDNF is similar to that of microglia depleted animals. In both cases, we observed a lower AMPA/NMDA ratio and a lower $GABA_A$/AMPA ratio in responses to thalamic fiber stimulation during the second postnatal week. Therefore, although we have not been able to measure directly BDNF proteins or mRNAs in developing microglia, it is very likely that the phenotype we observed in $CX3CR1^{CreER/+}::BDNF^{lox/lox}$ mice is due to the disruption of BDNF expression in microglia.

Microglia as the main source of BDNF maturating thalamocortical synapses

Our observation of a lower AMPA/NMDA ratio at thalamocortical synapses onto layer 4 neurons microglia BDNF knockout mice at P10-12 is in line with the study of Itami and co-workers that showed that BDNF unmasks silent thalamocortical synapses in the barrel cortex

during postnatal development (Itami *et al.*, 2003). Specifically, these authors demonstrated that synapses with NMDA receptors but no AMPA receptors (*i.e.* so-called silent synapses) were prominent in BDNF knockout mice from P3 to P12. Silent synapses represent the extreme case of synapses with low AMPA/NMDA ratio and our data indicate that these effects observed with a general knockout mouse were reproduced in a microglia-specific BDNF knockout. Interestingly, we also observed that the AMPA/NMDA ratio did not change between P10-12 and P30-35 microglial cells knockout for BDNF. This is in marked contrast with the striking decrease of this ratio in wildtype mice during this range of development, which leads to a paradoxical situation in adult animals with AMPA/NMDA ratio larger in microglia BDNF knockout than in wildtype mice. These observations also suggest that there are no other sources of BDNF than microglia that can drive the maturation of the AMPA/NMDA ratio at thalamocortical synapses.

Regarding the development of the thalamocortical feedforward inhibition, we observed a similar impairment of the $GABA_A$/AMPA ratio in P10-12 mice either microglia depleted or knockout for BDNF. This indicates that microglia BDNF regulates the maturation of this disynaptic circuit but the site at which this regulation occurs remains to be identified. In theory, microglial BDNF could act by boosting thalamocortical excitation of fast-spiking interneurons, which are the main type of interneurons responsible for the thalamocortical feedforward inhibition (Koelbl *et al.*, 2015 ; Rudy *et al.*, 2011), by increasing the excitability of these interneurons, or by enhancing GABAergic transmission between fast-spiking interneurons and principal neurons of the barrels. To our knowledge, there has been no study of BDNF effect on synapses between thalamic fibers and fast-spiking interneurons in the cortex but BDNF contributes to the maturation of intrinsic properties of fast-spiking interneurons of the barrel cortex after the second postnatal week (Itami *et al.*, 2007). Moreover, the activity-dependent expression of BDNF drives the maturation of perisomatic inhibition provided by parvalbumin-expressing fast-spiking interneurons onto spiny stellate cells of the barrel cortex (Jiao *et al.*, 2011). The authors showed that in mice knockout for the BDNF promoter IV, which is largely responsible for the activity-dependent expression of BDNF in the cortex, the excitatory/inhibitory (E/I) balance was impaired as a consequence of lower inhibitory perisomatic inputs provided by parvalbumin fast-spiking neurons. Although they used local stimulations to study the E/I balance, it is very likely that thalamocortical feedforward inhibition, which relies mostly on fast-spiking neurons, would have been impaired in these mice. If true, our results showing that microglial BDNF contributes to the

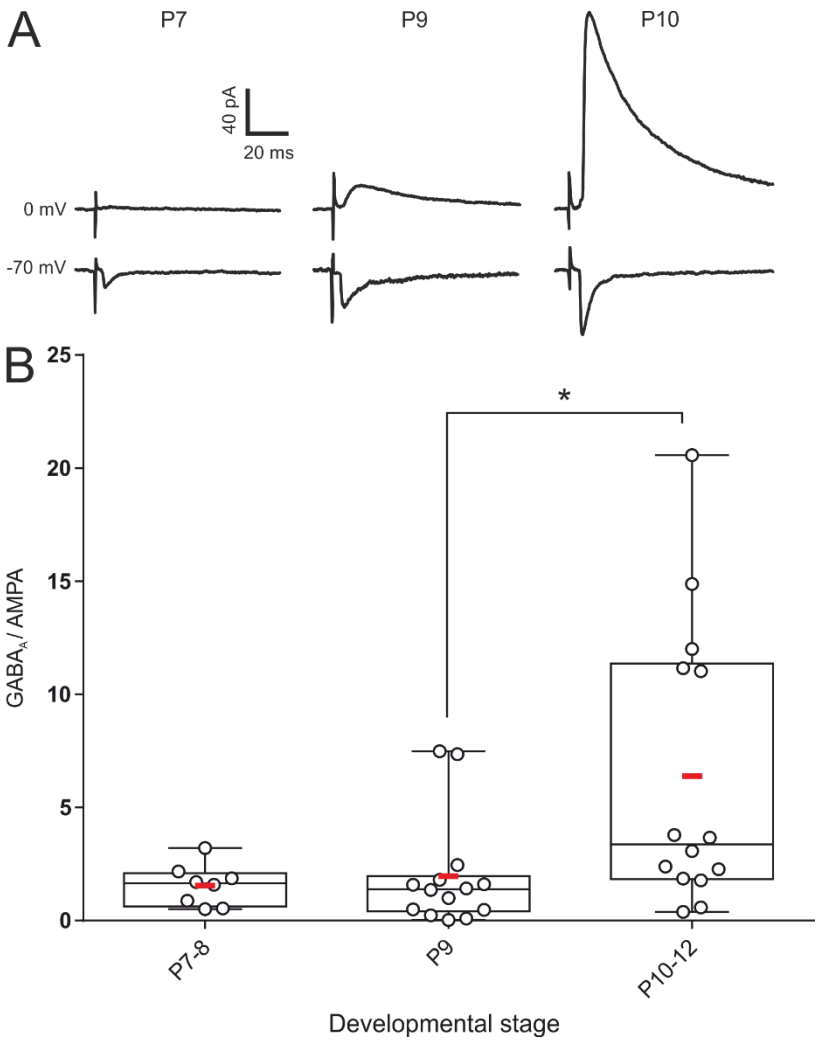
maturation of thalamocortical feedforward inhibition may therefore suggest that this action of microglial BDNF is activity-regulated. However, activity-dependent regulation of feedforward inhibition at early stages of the establishment of inhibition in the barrel cortex has been also shown to occur independently of a direct modulation of inhibitory synapses but through the modulation of the thalamic drive of fast-spiking neurons and of postsynaptic excitatory responses of spiny stellate cells (Chittajallu and Isaac, 2010). Feedforward inhibition is therefore tightly controlled by activity at different levels of the di-synaptic circuits. This may explain why the $GABA_A$/AMPA ratio, which is lower at P10-12 in microglia BDNF knockout than in wildtype mice, become larger in mutant than in wildtype mice at P30-35. The absence of microglial BDNF that leads to an impaired E/I balance during the second postnatal week may trigger compensatory mechanisms that promotes a secondary increase of the thalamocortical disynaptic inhibitory drive in the barrels. Additional experiments will be necessary to dissect out the mechanisms by which microglial BDNF controls this inhibitory circuits and how this interferes with other modulatory pathways of this important circuit for cortical sensory integration.

In conclusion, our results show that microglial BDNF is an important mediator of the functional maturation of thalamocortical circuits and of the adjustment of the E/I balance during the postnatal development of the barrel cortex.

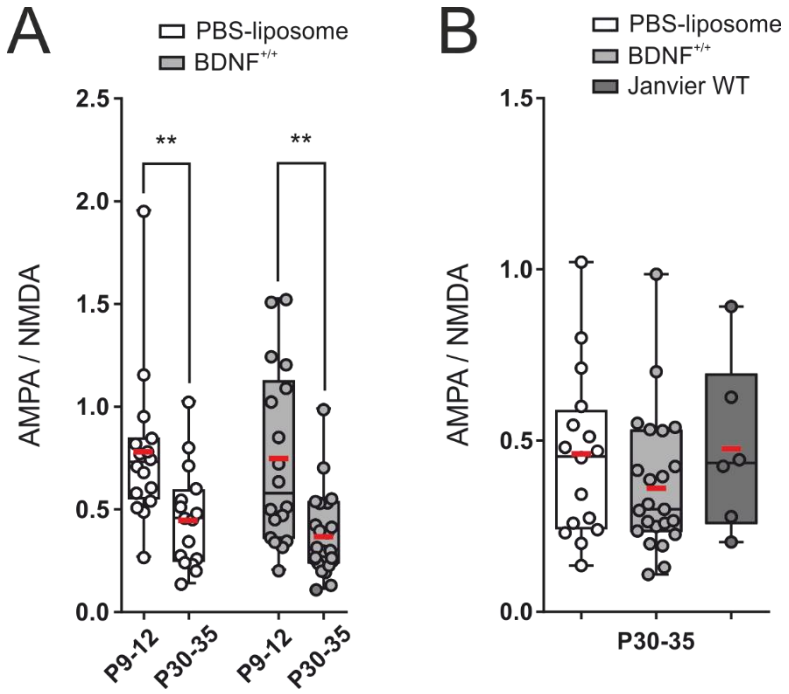
Acknowledgments

We are grateful to members of the Neurophysiology and New Microscopies lab for discussions and critical comments on the manuscript. Audinat lab was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM: DEQ20140329488). C-A. Mosser was supported by the Région Île-de-France (DIM Cerveau et Pensée) and by the FRM (FDT20170739030). We are grateful to M. Omnes and A. David for excellent technical assistance.

Supplementary figures



Supplementary figure I.S.1. Development of thalamocortical feedforward inhibition onto layer 4 principal neurons of the barrel cortex. A, Thalamocortical-evoked EPSCs at -70 mV, and thalamocortical-evoked IPSCs at 0mV, from three stellate cells at different developmental stages. The voltage-clamp traces are from a stellate cell at P7 that displayed no feedforward inhibition ($GABA_A$/AMPA ratio = 0), one at P9 with a $GABA_A$/AMPA ratio of 0.7 and one at P10 with a $GABA_A$/AMPA ratio of 3.1). **B**, Box-and-whisker/scatter plots of the amount of feedforward inhibition calculated as the $GABA_A$/AMPA peak amplitude ratio during postnatal development for all individual stellate cells recorded and binned for P7–P8, P9 and P10–12 age groups (Kruskal-Wallis statistic: 9.145, p = 0.010, P8: n = 8, P9: n = 14, P10-12: n = 14, Dunn's multiple comparisons test).



Supplementary figure I.S.2. Evolution of the AMPA/NMDA ratio at thalamocortical synapses during physiological development. A, Box-and-whisker/scatter plots of AMPA/NMDA ratios at P9-12 and P30-35 within control groups PBS-liposomes CX3CR1$^{+/eGFP}$ (Two-tailed Mann-Whitney U, p = 0.002, P9-12: N = 4, n = 16, median = 0.73; P30-35: N = 10, n = 16, median = 0.45) and CX3CR1$^{+/CreER}$:BDNF$^{+/+}$ (Two-tailed Mann-Whitney U, p = 0.001, P9-12: N = 8, n = 18, median = 0.57; P30-35: N = 12, n = 23, median = 0.30). **B**, Box-and-whisker/scatter plots of AMPA/NMDA ratios at P30-35 within control groups PBS-liposomes CX3CR1$^{+/eGFP}$, CX3CR1$^{+/CreER}$:BDNF$^{+/+}$ and WT purchased from Janvier (Kruskal-Wallis statistic: 1.990, p = 0.37, PBS-liposome: 10 animals, 16 cells; CX3CR1$^{+/CreER}$:BDNF$^{+/+}$: N = 12, n = 23, Janvier WT: N = 3, n = 6, Dunn's multiple comparisons test).

References

Agmon A, Connors BW (1991), Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortexin vitro. Neuroscience 41:365-379.

Arnoux I, Audinat E (2015), Fractalkine Signaling and Microglia Functions in the Developing Brain. Neural Plasticity 2015:1-8.

Bannister NJ (2005), Developmental Changes in AMPA and Kainate Receptor-Mediated Quantal Transmission at Thalamocortical Synapses in the Barrel Cortex. Journal of Neuroscience 25:5259-5271.

Bennett ML, Bennett FC, Liddelow SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, Mulinyawe SB, Bohlen CJ, et al. (2016), New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. Proceedings of the National Academy of Sciences 113:E1738-E1746.

Berghuis P, Dobszay MB, Sousa KM, Schulte G, Mager PP, Härtig W, Görcs TJ, Zilberter Y, et al. (2004), Brain-derived neurotrophic factor controls functional differentiation and microcircuit formation of selectively isolated fast-spiking GABAergic interneurons. European Journal of Neuroscience 20:1290-1306.

Brecht M, Sakmann B (2002), -Dynamic representation of whisker deflection by synaptic potentials in spiny stellate and pyramidal cells in the barrels and septa of layer 4 rat somatosensory cortex. The Journal of Physiology 543:49-70.

Buiting AMJ, Rooijen NV (1994), Liposome Mediated Depletion of Macrophages: An Approach for Fundamental Studies. Journal of Drug Targeting 2:357-362.

Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, Koeglsperger T, Dake B, et al. (2014), Identification of a Unique TGF-β Dependent Molecular and Functional Signature in Microglia. Nature neuroscience 17:131-143.

Cantaut-Belarif Y, Antri M, Pizzarelli R, Colasse S, Vaccari I, Soares S, Renner M, Dallel R, et al. (2017), Microglia control the glycinergic but not the GABAergic synapses via prostaglandin E2 in the spinal cord. The Journal of Cell Biology 216:2979-2989.

Chen Z, Jalabi W, Hu W, Park H-J, Gale JT, Kidd GJ, Bernatowicz R, Gossman ZC, et al. (2014), Microglial displacement of inhibitory synapses provides neuroprotection in the adult brain. Nature Communications 5.

Chittajallu R, Isaac JTR (2010), Emergence of cortical inhibition by coordinated sensory-driven plasticity at distinct synaptic loci. Nature neuroscience 13:1240-1248.

Chung S, Jeong J-H, Ko S, Yu X, Kim Y-H, Isaac JTR, Koretsky AP (2017), Peripheral Sensory Deprivation Restores Critical-Period-like Plasticity to Adult Somatosensory Thalamocortical Inputs. Cell Reports 19:2707-2717.

Coull JAM, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, et al. (2005), BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. Nature 438:1017-1021.

Cruikshank SJ, Lewis TJ, Connors BW (2007), Synaptic basis for intense thalamocortical activation of feedforward inhibitory cells in neocortex. Nature Neuroscience 10:462-468.

Cunningham CL, Martinez-Cerdeno V, Noctor SC (2013), Microglia Regulate the Number of Neural Precursor Cells in the Developing Cerebral Cortex. Journal of Neuroscience 33:4216-4233.

Daw MI, Scott HL, Isaac JTR (2007), Developmental synaptic plasticity at the thalamocortical input to barrel cortex: mechanisms and roles. Molecular and cellular neurosciences 34:493-502.

E. Hirbec H, Noristani HN, Perrin FE (2017), Microglia Responses in Acute and Chronic Neurological Diseases: What Microglia-Specific Transcriptomic Studies Taught (and did Not Teach) Us. Frontiers in Aging Neuroscience 9.

Elmore Monica RP, Najafi Allison R, Koike Maya A, Dagher Nabil N, Spangenberg Elizabeth E, Rice Rachel A, Kitazawa M, Matusow B, et al. (2014), Colony-Stimulating Factor 1 Receptor Signaling Is Necessary for Microglia Viability, Unmasking a Microglia Progenitor Cell in the Adult Brain. Neuron 82:380-397.

Gabernet L, Jadhav SP, Feldman DE, Carandini M, Scanziani M (2005), Somatosensory Integration Controlled by Dynamic Thalamocortical Feed-Forward Inhibition. Neuron 48:315-327.

Haimon Z, Volaski A, Orthgiess J, Boura-Halfon S, Varol D, Shemer A, Yona S, Zuckerman B, et al. (2018), Re-evaluating microglia expression profiles using RiboTag and cell isolation strategies. Nature Immunology 19:636-644.

Harlow EG, Till SM, Russell TA, Wijetunge LS, Kind P, Contractor A (2010), Critical period plasticity is disrupted in the barrel cortex of Fmr1 knockout mice. Neuron 65:385-398.

Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi T, Borowsky M, Wang L-c, Means TK, Khoury JE (2013), The Microglial Sensome Revealed by Direct RNA Sequencing. Nature neuroscience 16:1896-1905.

Hildebrand ME, Xu J, Dedek A, Li Y, Sengar AS, Beggs S, Lombroso PJ, Salter MW (2016), Potentiation of Synaptic GluN2B NMDAR Currents by Fyn Kinase Is Gated through BDNF-Mediated Disinhibition in Spinal Pain Processing. Cell Reports 17:2753-2765.

Hoshiko M, Arnoux I, Avignone E, Yamamoto N, Audinat E (2012), Deficiency of the microglial receptor CX3CR1 impairs postnatal functional development of thalamocortical synapses in the barrel cortex. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 32:15106-15111.

Huang ZJ, Kirkwood A, Pizzorusso T, Porciatti V, Morales B, Bear MF, Maffei L, Tonegawa S (1999), BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. Cell 98:739-755.

Inan M, Crair MC (2007), Development of Cortical Maps: Perspectives From the Barrel Cortex. The Neuroscientist 13:49-61.

Isaac JTR, Crair MC, Nicoll RA, Malenka RC (1997), Silent Synapses during Development of Thalamocortical Inputs. Neuron 18:269-280.

Itami C, Kimura F, Kohno T, Matsuoka M, Ichikawa M, Tsumoto T, Nakamura S (2003), Brain-derived neurotrophic factor-dependent unmasking of "silent" synapses in the developing mouse barrel cortex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100:13069-13074.

Itami C, Kimura F, Nakamura S (2007), Brain-Derived Neurotrophic Factor Regulates the Maturation of Layer 4 Fast-Spiking Cells after the Second Postnatal Week in the Developing Barrel Cortex. Journal of Neuroscience 27:2241-2252.

Jiao Y, Zhang Z, Zhang C, Wang X, Sakata K, Lu B, Sun Q-Q (2011), A key mechanism underlying sensory experience-dependent maturation of neocortical GABAergic circuits in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences 108:12131-12136.

Kang SS, Baker KE, Wang X, Kocher J-P, Fryer JD (2017), Translational Profiling Of Microglia Reveals Artifacts Of Cell Sorting.

Kitayama M, Ueno M, Itakura T, Yamashita T (2011), Activated Microglia Inhibit Axonal Growth through RGMa. PLoS ONE 6:e25234.

Koelbl C, Helmstaedter M, Lübke J, Feldmeyer D (2015), A Barrel-Related Interneuron in Layer 4 of Rat Somatosensory Cortex with a High Intrabarrel Connectivity. Cerebral Cortex 25:713-725.

Liang KJ, Lee JE, Wang YD, Ma W, Fontainhas AM, Fariss RN, Wong WT (2009), Regulation of Dynamic Behavior of Retinal Microglia by CX3CR1 Signaling. Investigative Opthalmology & Visual Science 50:4444.

Lu H-C, Gonzalez E, Crair MC (2001), Barrel Cortex Critical Period Plasticity Is Independent of Changes in NMDA Receptor Subunit Composition. Neuron 32:619-634.

Marín-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M (2004), Microglia Promote the Death of Developing Purkinje Cells. Neuron 41:535-547.

Marty S, da M, Berninger B (1997), Neurotrophins and activity-dependent plasticity of cortical interneurons. Trends in Neurosciences 20:198-202.

Miyamoto A, Wake H, Ishikawa AW, Eto K, Shibata K, Murakoshi H, Koizumi S, Moorhouse AJ, et al. (2016), Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. Nature Communications 7:12540.

Mosser C-A, Baptista S, Arnoux I, Audinat E (2017), Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future. Progress in Neurobiology 149-150:1-20.

Nelson LH, Lenz KM (2017), Microglia depletion in early life programs persistent changes in social, mood-related, and locomotor behavior in male and female rats. Behavioural Brain Research 316:279-293.

Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, et al. (2011), Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. Science (New York, NY) 333:1456-1458.

Parkhurst Christopher N, Yang G, Ninan I, Savas Jeffrey N, Yates John R, Lafaille Juan J, Hempstead Barbara L, Littman Dan R, et al. (2013), Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. Cell 155:1596-1609.

Petersen CCH (2007), The Functional Organization of the Barrel Cortex. Neuron 56:339-355.

Pont-Lezica L, Beumer W, Colasse S, Drexhage H, Versnel M, Bessis A (2014), Microglia shape corpus callosum axon tract fasciculation: functional impact of prenatal inflammation. European Journal of Neuroscience 39:1551-1557.

Rios M, Fan G, Fekete C, Kelly J, Bates B, Kuehn R, Lechan RM, Jaenisch R (2001), Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. Molecular Endocrinology (Baltimore, Md) 15:1748-1757.

Rogers JT, Morganti JM, Bachstetter AD, Hudson CE, Peters MM, Grimmig BA, Weeber EJ, Bickford PC, et al. (2011), CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 31:16241-16250.

Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J (2011), Three Groups of Interneurons Account for Nearly 100% of Neocortical GABAergic Neurons. Developmental neurobiology 71:45-61.

Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, et al. (2012), Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. Neuron 74:691-705.

Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y, Sato K (2014), Microglia Enhance Neurogenesis and Oligodendrogenesis in the Early Postnatal Subventricular Zone. Journal of Neuroscience 34:2231-2243.

Squarzoni P, Oller G, Hoeffel G, Pont-Lezica L, Rostaing P, Low D, Bessis A, Ginhoux F, et al. (2014), Microglia modulate wiring of the embryonic forebrain. Cell Reports 8:1271-1279.

Staiger JF (2004), Functional Diversity of Layer IV Spiny Neurons in Rat Somatosensory Cortex: Quantitative Morphology of Electrophysiologically Characterized and Biocytin Labeled Cells. Cerebral Cortex 14:690-701.

Sun Q-Q, Zhang Z, Sun J, Nair AS, Petrus DP, Zhang C (2014), Functional and structural specific roles of activity-driven BDNF within circuits formed by single spiny stellate neurons of the barrel cortex. Frontiers in Cellular Neuroscience 8.

Trang T, Beggs S, Wan X, Salter MW (2009), P2X4-Receptor-Mediated Synthesis and Release of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Microglia Is Dependent on Calcium and p38-Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. Journal of Neuroscience 29:3518-3528.

Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Kikuta J, Ishii M, Yamashita T (2013), Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. Nature neuroscience 16:543-551.

Ulmann L, Hatcher JP, Hughes JP, Chaumont S, Green PJ, Conquet F, Buell GN, Reeve AJ, et al. (2008), Up-Regulation of P2X4 Receptors in Spinal Microglia after Peripheral Nerve Injury Mediates BDNF Release and Neuropathic Pain. Journal of Neuroscience 28:11263-11268.

VanRyzin JW, Yu SJ, Perez-Pouchoulen M, McCarthy MM (2016), Temporary Depletion of Microglia during the Early Postnatal Period Induces Lasting Sex-Dependent and Sex-Independent Effects on Behavior in Rats. eNeuro 3.

Wakselman S, Bechade C, Roumier A, Bernard D, Triller A, Bessis A (2008), Developmental Neuronal Death in Hippocampus Requires the Microglial CD11b Integrin and DAP12 Immunoreceptor. Journal of Neuroscience 28:8138-8143.

Xenos D, Kamceva M, Tomasi S, Cardin JA, Schwartz ML, Vaccarino FM (2017), Loss of TrkB Signaling in Parvalbumin-Expressing Basket Cells Results in Network Activity Disruption and Abnormal Behavior. Cerebral Cortex:1-15.

Yamamoto N, Hanamura K (2005), Formation of the Thalamocortical Projection Regulated Differentially by BDNF- and NT-3-Mediated Signaling. Reviews in the Neurosciences 16.

Microglia and prenatal inflammation regulate local and horizontal wiring of inhibitory circuits

Morgane Sonia Thion[1,6], Coralie-Anne Mosser[2,6], Isabelle Ferezou[3], Pauline Grisel[1], Sofia Baptista[2], Donovan Low[4], Florent Ginhoux[4], Sonia Garel[1,7,*] and Etienne Audinat[2,5,7,*]

[1]Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure (IBENS), École Normale Supérieure, CNRS, INSERM, PSL Research University, 75005 Paris, France

[2]Neurophysiologie et Nouvelles Microscopies, INSERM U1128, Université Paris Descartes, 75006 Paris, France

[3]Unité de Neuroscience, Information et Complexité (UNIC), CNRS, FRE 3693, 91198 Gif-sur-Yvette, France

[4]Singapore Immunology Network (SIgN), Agency for Science, Technology and Research (A*STAR), Singapore 138648, Singapore

[5]Institut de Génomique Fonctionnelle (IGF), CNRS, INSERM, Université of Montpellier, 34094 Montpellier, France

[6] The authors contributed equally to the work.

[7]The authors contributed equally to the work.

*corresponding authors: garel@biologie.ens.fr, etienne.audinat@igf-cnrs.fr

Présentation de l'article

L'activation du système immunitaire maternel pendant la grossesse est aujourd'hui bien établie comme facteur de risque de développer des maladies neuropsychiatriques chez la descendance, mais les mécanismes sous-jacents menant à l'altération des fonctions cérébrales, en particulier de la neurotransmission inhibitrice, sont inconnus.

Etant données leurs fonctions fondamentales dans le développement adéquat du SNC, les cellules microgliales apparaissent comme des candidats idéaux pour le rôle d'intermédiaire entre MIA et dysfonctionnements neurologiques. Un nombre croissant de découvertes indique une corrélation entre pathologies neuropsychiatriques et fonctionnement de la transmission GABAergique (Schmidt and Mirnics, 2014). Cependant, très peu de travaux ont étudié la contribution des cellules microgliales à la régulation de l'activité inhibitrice. La microglie activée peut déplacer les terminaisons présynaptiques de GABAergique chez l'adulte, ce qui entraîne une hausse de l'activité synchronisée et conduit à l'expression de protéines anti-apoptotiques (Chen *et al.,* 2014). Elle a également été impliquée dans la régulation du développement synaptique glycinergique dans la moelle épinière *via* une signalisation impliquant la prostaglandine E2 (Cantaut-Belarif *et al.,* 2017). Enfin, il a été montré que perturber l'activité microgliale durant le développement embryonnaire provoque une entrée prématurée des précurseurs d'interneurones PV dans la plaque corticale (Squarzoni *et al.,* 2014).

Nous nous sommes donc intéressés aux conséquences postnatales sur l'inhibition de deux types de perturbations microgliales embryonnaires : l'induction d'une MIA par injection de LPS et l'élimination de cellules microgliales par injection d'un anticorps anti-CSF1-R. Nous avons combiné analyses anatomiques et physiologiques en étudiant d'une part la distribution et la densité des interneurones corticaux, et d'autre part leur connectivité fonctionnelle.

Abstract

Prenatal inflammation is a risk factor for the development of neuropsychiatric diseases. Animal models of maternal immune activation (MIA) and transient prenatal absence of microglia affects the number of cortical parvalbumin-positive (PV) inhibitory interneurons, which are instrumental in setting up functional properties of the cortical network and are key actors in neuropsychiatric diseases. However, whether immune challenges change functional development of PV neuron wiring remains unknown. Here, we show that MIA and transient embryonic microglia depletion induce a transient increase in the number of PV cells during postnatal development of the mouse somatosensory cortex. This is accompanied by an increase in the strength of unitary connections made by PV interneurons onto layer 4 principal neurons and by aberrant horizontal inhibition across cortical columns. *In vivo*, these changes result in a decreased lateral propagation of sensory inputs within the somatosensory cortex. These unexpected developmental impacts on the functional organization of PV inhibitory circuits provide novel insights onto how microglia dysfunction or immune risks lead to pathological brain wiring.

Introduction

Prenatal inflammation and dysfunction of microglia, the brain resident macrophages, have both been associated with the etiology of several neuropsychiatric disorders, including schizophrenia (SZ) and autism spectrum disorders (ASD) (Beumer *et al.*, 2012 ; Choi *et al.*, 2016 ; Hanamsagar and Bilbo, 2017 ; Mattei *et al.*, 2017 ; Patterson, 2011). The implication of microglia in mediating the consequences of maternal immune activation (MIA) remains, however, controversial (Smolders *et al.*, 2018) and, moreover, the mechanisms through which an immune challenge and microglia mobilization *in utero* could lead to such developmental disorders remain poorly understood. Microglia invade the brain during mid-embryogenesis and could thus exert prenatal and perinatal roles during normal and pathological brain wiring (Mosser *et al.*, 2017 ; Thion and Garel, 2017). Particularly, microglia have been shown to modulate the early development and subsequent laminar positioning of inhibitory fast spiking (FS) Parvalbumin-expressing (PV) interneurons in the murine somatosensory cortex (Squarzoni *et al.*, 2014). These inhibitory interneurons play important roles in the plasticity and functional maturation of the neocortical network during development (Butt *et al.*, 2017 ; Hensch, 2005) and increasing evidence points toward dysfunctional networks of PV interneurons in neurodevelopmental psychiatric disorders (Nelson and Valakh, 2015). Interestingly, a reduced functional GABAergic transmission from PV neurons has been reported in the mouse cortex of adult offspring after MIA (Canetta *et al.*, 2016). However, the involvement of microglia in this effect has not been explored nor the potential consequences of early microglia deficits and immune challenges on the developmental trajectory of PV networks. Here, by combining experimental approaches, we show that transient early microglia depletion and prenatal inflammation lead to a profound miswiring of PV interneurons in layer 4 of the postnatal barrel cortex. These observations reveal a novel impact of immune challenges on cortical wiring with importance for understanding the etiology of neurodevelopmental disorders and designing effective interventional therapies.

Experimental procedures

Mice

Mice were housed at the “Institut de Biologie de l’ENS” (IBENS) and at the “Centre universitaire des Saints Pères” of Paris Descartes University, Paris, France. These mice were handled in accordance with European regulations following the recommendations of the local ethics committees. Experiments were performed in conformity with the European

(2010/63/UE) and French legislations relative to the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (authorization numbers: 2012-0068 delivered by the local ethical committee #59 for IBENS and CEEA34.EA.027.11 and CEEA16-032 for Paris Descartes). For microglia characterization we used *Cx3cr1*$^{eGFP/+}$ mice (Jung et al, 2000). For visualizing PV interneurons, we crossed *PV*$^{Cre/Cre}$ (Hippenmeyer *et al.*, 2005) and Ai14 mice (B6;129S6-Gt(ROSA)$^{26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze}$/J, Jackson Laboratory), resulting in the expression of tdTomato in the parvalbumin-expressing interneurons in the offspring. For the optogenetic recordings, *PV*$^{Cre/Cre}$ mice were crossed with Ai32 floxed mice (B6; 129S-Gt(ROSA)26Sor$^{tm32(CAG-COP4*H134R/EYFP)Hze}$/J, Jackson Laboratory), resulting in the expression of channelrhodopsin (ChR2H134R) and eYFP in parvalbumin-expressing interneurons.

Microglial embryonic depletion and LPS prenatal injections

Embryonic day (E) 0.5 was set as the day of vaginal plug formation on the dam, with postnatal day (P) 0 defined as the day of birth. Pregnant C57/Bl6 females were administered anti-CSF-1R monoclonal antibody aCSF-1R intraperitoneally at E6.5 and E7.5 (3 mg per day in sterile PBS).

Pregnant C57/Bl6 females were administered LPS in sterile PBS (0.12 mg/g mouse; InvivoGen) at E13.5 by a single intraperitoneal injection. Control C57/Bl6 pregnant females were injected at E13.5 with sterile PBS and showed no detectable phenotype. Three different batches of LPS were used and produced similar results.

Immunostainings

Intracardiac perfused and dissected brains were fixed in 4% PFA at 4°C from overnight. Immunohistochemistry was performed on 40 µm thick free-floating vibratome sections, as previously described (Squarzoni *et al.*, 2014). Sections were blocked for 2 hours with PBS containing 10% fetal bovine serum and 0.01% TritonX-100, and then incubated overnight with primary antibodies. Sections were rinsed twice in PBS containing 0.01% TritonX-100, followed by several PBS washes, before overnight incubation with secondary antibodies (1/400 in PBS). Hoechst (1/1000) was used for fluorescent nuclear counterstaining.

Image acquisition

To determine cells density, images of the somatosensory neocortex were acquired at 10X with the Leica TCS SP5 confocal microscope. ImageJ and Adobe Photoshop were used for image processing.

Image analysis

Iba1-, GFP-, PV- and dsred- positive cells were quantified using Imaris software. Images were converted greys and inverted before counting. Hoechst and vglut2 stainings were used to delineate the different cortical layers.

Electrophysiology

Slice preparation. Mice aged between 20 and 25 days (juvenile) or between 60 and 65 days (adult) were anesthetized with isoflurane, decapitated, and slices through the somatosensory cortex were cut using a Leica VT1200 vibratome in an oxygenated (5% CO2 and 95% O2) ice-cold protective extracellular solution containing for the juvenile mice (in mM): 215 sucrose, 2.5 KCl, 1.3 NaH_2PO_4, 25.9 $NaHCO_3$, 20 D-glucose, 5 sodium pyruvate, 7 $MgCl_2$, and 1 $CaCl_2$ (pH 7.3, 320 mOsm), or for the adult mice (in mM): 93 NMDG, 2.5 KCl, 1.2 NaH_2PO_4, 30 $NaHCO_3$, 20 HEPES, 2 thiourea, 25 D-glucose, 5 sodium ascorbate, 3 sodium pyruvate, 10 $MgCl_2$, and 0.5 $CaCl_2$ (pH 7.3, 315 mOsm). After cutting, slices of young animals were incubated for 30 min at 34°C in regular artificial cerebro-spinal fluid (aCSF; pH 7.3, 310 mOsm) containing (in mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 26 $NaHCO_3$, 1.25 NaH_2PO_4, 20 mM D-glucose, 1 sodium pyruvate, 1 $MgCl_2$, and 2 $CaCl_2$. For older animals, slices were first incubated in the same protective NMDG-containing extracellular solution for 7 min at 34°C and then incubated at 34°C for 30 min in regular aCSF. The slices were then maintained at room temperature (RT, 22-24°C) for 0.5–6h oxygenated aCSF until the recordings. After the incubation, individual slices selected for best visibility of the barrel field in cortical layer 4 were transferred to a recording chamber perfused with the same solution at 5 ml/min at RT.

Optogenetic stimulations. Coronal cortical slices were prepared from $PV^{Cre/+}::Ai32^{lox/+}$ juvenile mice. Whole-cell patch-clamp recordings were obtained from excitatory principal cells (PC) and parvalbumin-expressing (PV) fast-spiking interneurons of the layer 4 of the somatosensory barrel cortex in voltage- and current-clamp modes respectively. For voltage-clamp recordings patch pipettes (3-5 MΩ) were filled with a solution containing (in mM): 125 $CsMeSO_3$, 10 HEPES, 10 EGTA, 8 TEA-Cl, 5 4-AP, 0.4 GTP-Na, 4 ATP-Na_2, 1 $CaCl_2$ and 1 $MgCl_2$ (pH 7.3, 290 mOsm). For current-clamp recordings pipettes (3-5 MΩ) were filled with a solution containing in mM: 125 K-Gluconate, 2 $MgCl_2$, 10 HEPES, 0.4 Na^+-GTP, 4 ATP-Na_2, 10 Phosphocreatine disodium salt, 5 KCl, 0.5 EGTA (pH 7.3, 290 mOsm). Recordings were performed using either Axopatch 200B or 700B amplifiers (Molecular Devices). Experiments were performed in the presence of the following glutamatergic receptors

blockers: 10 µM 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide disodium salt (NBQX; Hellobio) and 50 µM D-(–)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5; Hellobio). IPSCs recorded in principal layer 4 neurons were optogenetically evoked at 0 mV by driving the ChR2 activity in PV interneurons with 470 nm blue light (0.9 mW/mm2) delivered by a LED (Cairn Research, OptoLED) through the 40× water-immersion objective (Olympus). We used a 100 µm diameter light field (*i.e.* about the size of one barrel) and light stimulations of 5 ms were delivered at 0.05 Hz. In pilot experiments, the light intensity was adjusted to 1.5 times the threshold for eliciting one action potential in FS cells and we verified that this threshold did not differ among the different experimental groups (data not shown).

Paired recordings. Coronal cortical slices were prepared from $PV^{Cre/+}::Ai14^{lox/+}$ juvenile mice, thalamocortical slices were prepared from $PV^{Cre/+}::Ai14^{lox/+}$ adult mice. To establish a pair recording, a whole-cell recording from a dtTomato-positive interneuron in layer 4-barrel cortex was first obtained and then sequential whole-cell recordings were made from neighboring stellate cells within 50-100 µm. The presynaptic cell was patched with the previously described KGlu internal solution, and the postsynaptic with the previously described Cs-based internal solution. Presynaptic PV interneurons were held in voltage clamp at -70 mV and induced to fire single action potentials by 4 depolarizing pulses of 50 mV of 1 ms at 20 Hz. Postsynaptic cells were held in voltage-clamp at 0 mV. Paired recordings were performed in presence of the AMPA receptor antagonist (NBQX; 10 µM, Tocris or Hellobio) and the NMDA receptor antagonist (D-AP5; 50µM, Tocris or Hellobio).

Data acquisition and analysis. Whole-cell patch-clamp recordings were obtained using Multiclamp 700B patch amplifiers (Molecular Devices). Currents and potentials were low-pass filtered at 5 kHz or 6 kHz, collected at a 10 kHz frequency, and analyzed off-line using pClamp 10.7 (Molecular Devices) for voltage-clamp recordings, or using a custom written procedure in IGOR Pro 6.0 (Wavemetrics) for current-clamp recordings. For all recordings performed with K-gluconate or Cs-gluconate in the pipette, potentials were corrected for a junction potential of -10 mV. Series resistances (Rs) were not compensated but continuously monitored using 5 or 10 mV hyperpolarizing pulses. Recordings were discarded if Rs increased by >20% during the whole experiment. For all experiments, the amplitude of EPSCs and IPSCs were quantified from the average of 15–30 consecutives responses. For paired-recordings analysis, the peak response to each stimulation was averaged over all trials, and the paired-pulse ratio was calculated as the average peak amplitude of the second response divided by that of the first one. In current clamp, to characterize basic membrane

properties, a series of hyperpolarizing and depolarizing current steps were applied for 1 s in 25-50 pA increments at 5 s intervals. The action potential threshold was determined for the first spike at the lowest level of depolarizing current required to evoke at least one spike. Pairs obtained with presynaptic cells displaying low firing rate or adaptation ratio (<0.6) or small AHP (<10 pA) were discarded.

Voltage-sensitive dye (VSD) imaging

VSD imaging of the cortical activity evoked by tactile whisker stimulation was performed on P27-P33 mice under isoflurane anesthesia (induction: 3-4%, maintenance 1-1.5%). The left barrel cortex was exposed and stained for 1h with the VSD RH1691 (Optical Imaging Ldt, Israel) at 1mg/ml, in Ringer's solution containing [in mM]: 135 NaCl, 5 KCl, 5 HEPES, 1.8 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$. After removing the unbound dye, the cortex was covered with agarose (0.5-1%) and a coverslip. Cortical imaging was performed through a tandem-lens fluorescence microscope (SciMedia), equipped with one Leica PlanApo 5x (objective side) and one Leica PlanApo 1x (condensing side), a 100 W halogen lamp gated with an electronic shutter, a 630 nm excitation filter, a 650 nm dichroic mirror, and a long-pass 665 nm emission filter. The field of view was 2.5 x 2.5 mm, resulting in a pixel resolution of 25 x 25 µm.

The right C2, C3 or C4 macrovibrissae were individually deflected in a pseudo-randomized manner using a multi-whisker stimulator (Jacob *et al.*, 2010). Whiskers were inserted keeping their natural angle in 27G stainless steel tubes attached to the piezoelectric benders (Noliac, Denmark), leaving 2 mm between the tip of the tube and the whisker base. Each whisker deflection consisted of a 95 µm displacement (measured at the tip of the tube) a 2 ms rising time, a 2 ms plateau and a 2 ms fall. Specific filters were applied to the voltage commands to prevent mechanical ringing of the stimulators. Using a CMOS-based camera (MiCam Ultima, SciMedia), sequences of images of 1 s were acquired at 500 Hz, with or without (blank trials) whisker stimulation, alternately, every 20 s. Variations of the light intensity were initially recorded as variations over the resting light intensity (first acquired frame).

Acquisition and data preprocessing were done using in-house software (Elphy, G. Sadoc, UNIC-CNRS), further analyses were made using custom written routines in IgorPro (WaveMetrics, USA). Subtraction of a pixel by pixel best-fit double-exponential from the averaged unstimulated sequence was used to correct for photobleaching.

For each averaged whisker evoked response (n = 20 trials), a 2D-gaussian fit of the evoked signal at 12 ms following the start of the whisker stimulus was used to localize the center of a first region of interest (ROI) defined as a 100 µm-diameter circle. A second, more distal ROI, was defined as a 100 µm-wide ring placed at 575 µm from the center of the first ROI. Profiles of fluorescence were computed from these ROIs and normalized to determine the latency to 80% of the peak. Responses with amplitudes <0.1% were discarded from the analysis. Signals measured in response to the deflection of the 3 individual whiskers were considered as independent.

Statistics

Data were analyzed and plotted using GraphPad Prism. All data are presented as mean ±SEM. One-way ANOVA with Tukey *post hoc* test or two-way ANOVA with Holm-Sidak *post ho*c test were used to compare groups of data, and non-parametric two-tailed Mann-Whitney *U*-tests were used to compare two distributions. Variances were similar between compared distributions. For multiple comparisons or, if the normality test failed, Kruskal-Wallis on Ranks was performed followed by a Dunn's test for multiple comparisons.

$P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical data are showed as aligned dot plot with mean ± SEM or histograms. All graphs are made with CorelDRAW. Numbers of cells are given in the legend or on the histograms. Throughout the text n refers to the number of cells and N to the number of animals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Data availability.

The data supporting the findings of this study are available upon request to the corresponding authors.

Results

To investigate how prenatal microglia and inflammation impact on the development of inhibitory circuits, we used mouse models to label both microglia (*Cx3cr1*$^{gfp/+}$) and PV interneurons (*PV*^{cre}*::Ai14*$^{lox/+}$) in two experimental paradigms. The first one consists in a transient depletion of microglia induced by the injection of an anti-Csf1R antibody, which leads to a strong depletion of microglia from E7 to E18.5, followed by a repopulation that is completed by P7 (Squarzoni *et al.*, 2014 ; Waisman *et al.*, 2015)]. The second one is a MIA triggered by a lipopolysaccharide (LPS) injection at E13.5, which mimics a bacterial infection

at midneurogenesis. Both models were previously shown to cause an increase in the number of inhibitory interneurons entering the cortical plate (Squarzoni *et al.*, 2014). We thus examined how the barrel cortex develops in this context.

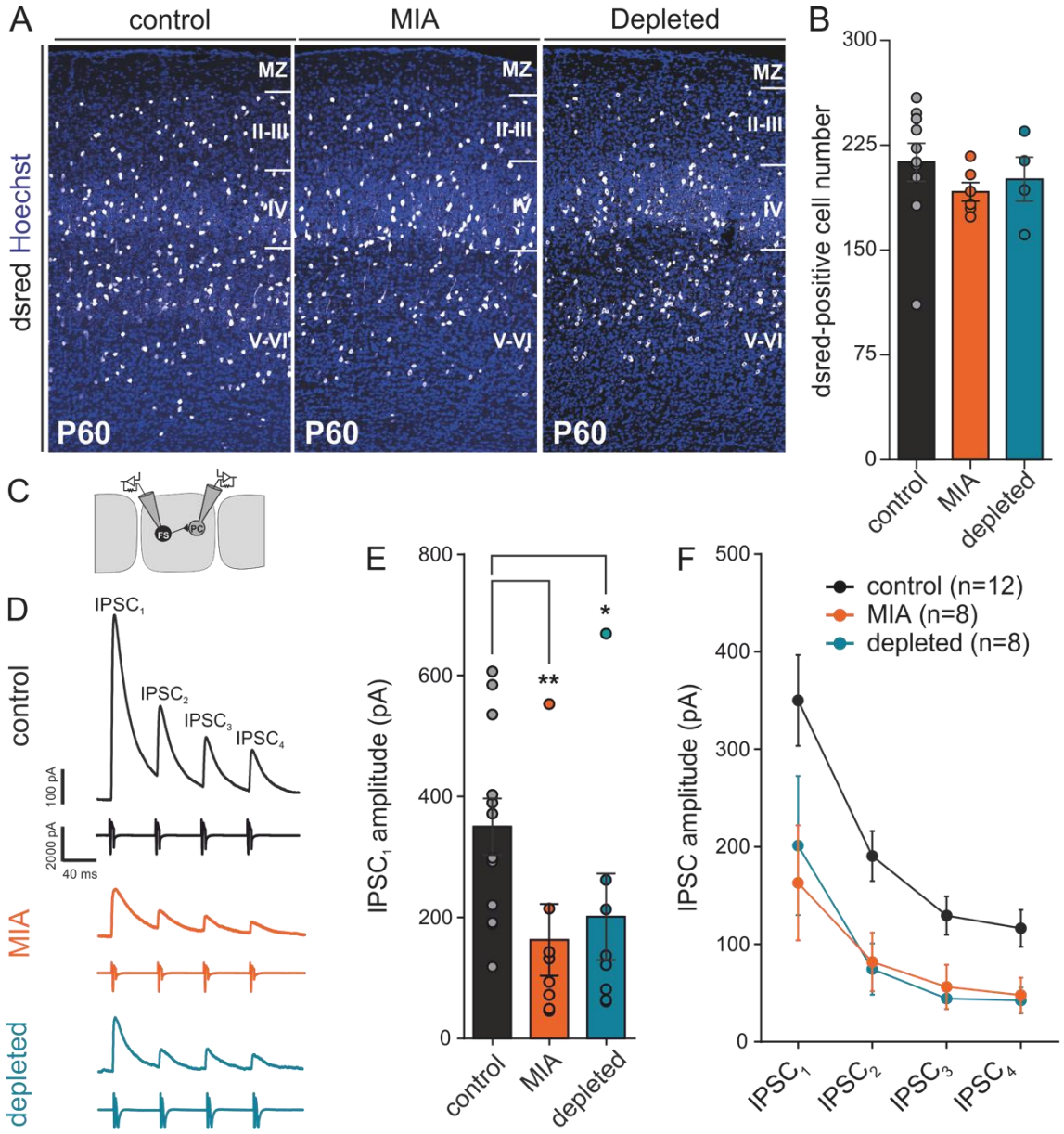


Figure II.1. Maternal immune activation and *in utero* microglia depletion do not affect the density of parvalbumin interneurons but decrease the synaptic strength between parvalbumin interneurons and principal cells in the input layer of the barrel cortex of adult mice. **A**, Coronal sections through the primary somatosensory cortex of control, MIA and microglia depleted P60 $PV^{Cre/+}$::$Ai14^{lox/+}$ mice revealing dsred-positive interneurons (white) and the nucleus marker Hoechst (purple). **B**, Comparison of PV interneurons density within all cortical layers between controls, MIA and depleted P60 mice (control: N = 10, MIA: N = 6, depleted: N = 4). **C**, Scheme of the recording configuration depicting dual whole-cell recordings from a fast-spiking PV interneuron (FS) targeting a layer 4 principal cell (PC) in the barrel cortex. **D**, Representative average traces of inhibitory postsynaptic currents ($IPSC_{1-4}$) evoked in PC by trains of action potentials elicited in FS interneurons

in thalamocortical slices of control, MIA and microglia-depleted P60 mice. **E**, Comparison of the first IPSC ($IPSC_1$) amplitude (Mann Whitney U test, control *vs* MIA p = 0.009, control *vs* depleted p = 0.038; control: N = 6, n = 12; MIA: N = 4, n = 8; depleted: N = 3, n = 8). **F**, Comparison of the IPSC amplitude evolution during the train between the three experimental conditions.

We first characterized the layering organization and barrel architecture during the first postnatal week using the thalamocortical axonal marker, vGlut2, during the first postnatal week. In coronal and tangential sections of flattened cortex, we found that the barrel field appears similarly organized at postnatal day (P) 7 after *in utero* microglia depletion, MIA or controls experiments (**Suppl. Fig. II.S.1A-K**). Importantly, the number of microglia remained unchanged in the barrel fields of both MIA and microglia depleted mice (**Suppl. Fig. II.S.1L-M**).

We then used $PV^{cre/+}::Ai14^{tlox//+}$ mice to count the number of PV cells in the somatosensory cortex at P60. We found no change in the density of PV cells in MIA and depleted mice within the barrel cortex (**Fig. II.1A-B**; **Suppl. Fig. II.S.2A**). To determine whether prenatal microglia depletion and MIA influence cortical inhibition at postnatal stages, we first recorded unitary inhibitory synaptic connections made by PV fast-spiking (FS) interneurons onto principal excitatory neurons contained within the same barrel at P60-65 (**Fig. II.1C-D**). The amplitude of the unitary synaptic responses was almost twice smaller than in the barrels of control mice (**Fig. II.1D-F**). These results are in good agreement with previous findings reporting lower synaptic inhibition mediated by PV cells in the prefrontal cortex of offspring after MIA (Canetta *et al.*, 2016). They further show that MIA and transient prenatal depletion of microglia have the same consequences on adult offspring inhibitory connections made by PV cells.

Next, we explored the developmental trajectory of the PV network. At P20, we found an increased density of PV neurons after MIA and after *in utero* microglia depletion (**Fig. II.2A-B** and **Suppl. Fig. II.S.2B**). We observed no significant differences between male and female (data not shown). Next, we recorded unitary inhibitory synaptic connections made by PV FS interneurons onto principal excitatory cells in the same barrel at P20-25 (**Fig. II.2C-D**). The amplitude of the unitary synaptic responses was almost twice larger in MIA and in microglia depleted than in control mice (**Fig. II.2D-F**). The short-term dynamics of unitary IPCs evoked by trains of presynaptic action potentials was not dramatically affected, although a small but consistent decrease in paired-pulse ratio, consistent with a small increase in release probability, was observed (data not shown).

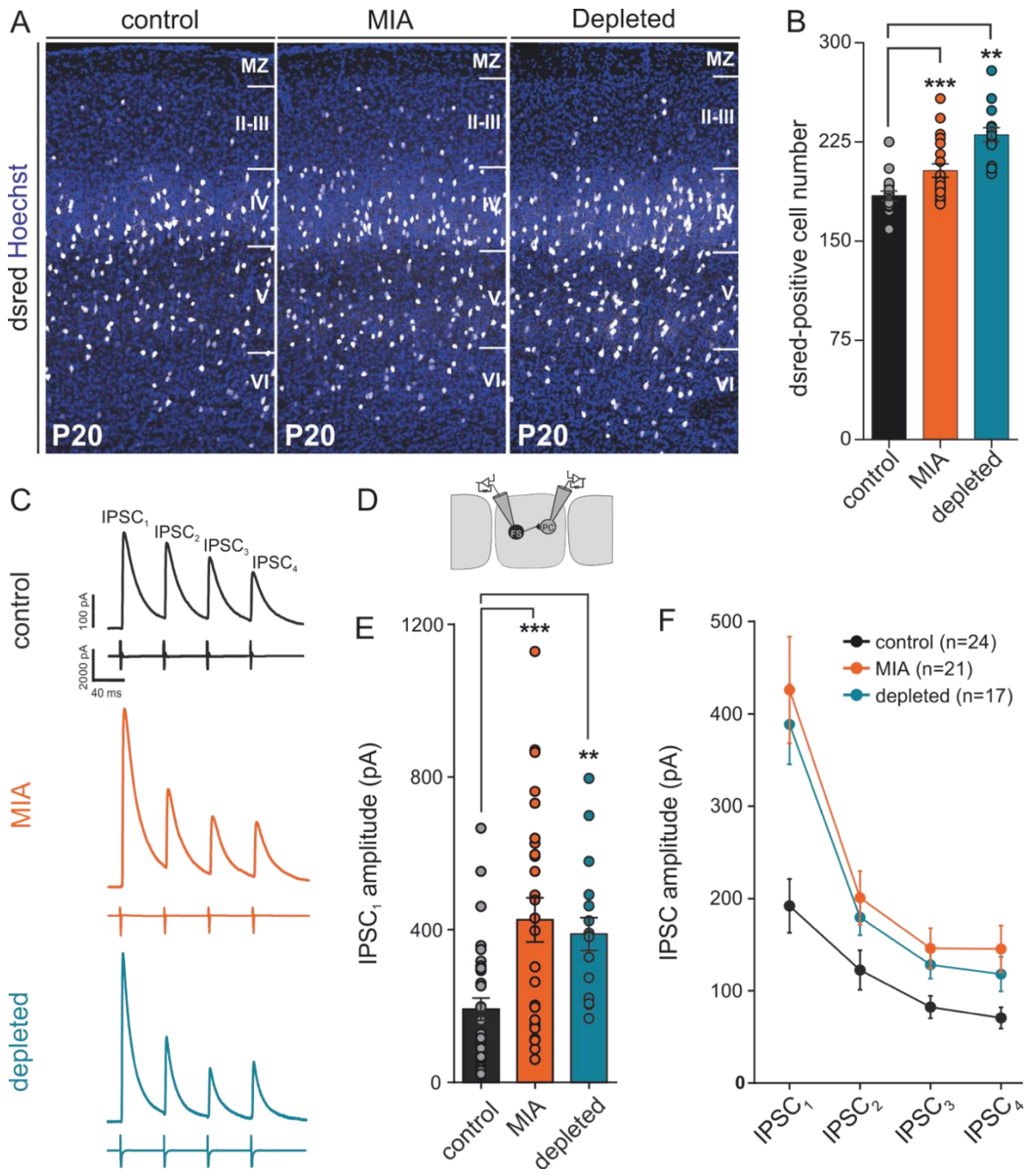


Figure II.2. Maternal immune activation and *in utero* microglia depletion alter the density of PV interneurons and enhance synaptic strength at FS-PC synapses in the input layer of the barrel cortex of juvenile mice. A, Coronal sections through the primary somatosensory cortex of control, MIA and microglia depleted P20 $PV^{/Cre}$::$Ai14^{lox/+}$ mice showing the increased number of PV interneurons (dsred). **B**, Comparison of PV interneurons density within all cortical layers between controls, MIA and depleted P20 mice (control: N = 13, MIA: N = 17, depleted: N = 13). **C**, Representative average traces of inhibitory postsynaptic currents ($IPSC_{1-4}$) evoked in PC by trains of action potentials elicited in FS interneurons in coronal cortical slices of control, MIA and microglia-depleted P20-25 mice. **D**, Scheme of the recording configuration. **E**, Comparison of the $IPSC_1$ amplitude (Kruskal-Wallis test, p = 0.0002; control: N = 13, n = 31; MIA: N = 13, n = 26; depleted: N = 7, n = 17). **F**, Comparison of the IPSC amplitude evolution during the train between the three experimental conditions.

To explore the spatial pattern of functional projections of developing PV cells, we used $PV^{cre/+}::Ai32^{lox/+}$ mice and measured the inhibitory drive of single spiny cells evoked by the optogenetic activation of PV interneurons of the same or of neighboring barrels (**Fig. II.3A-G**).

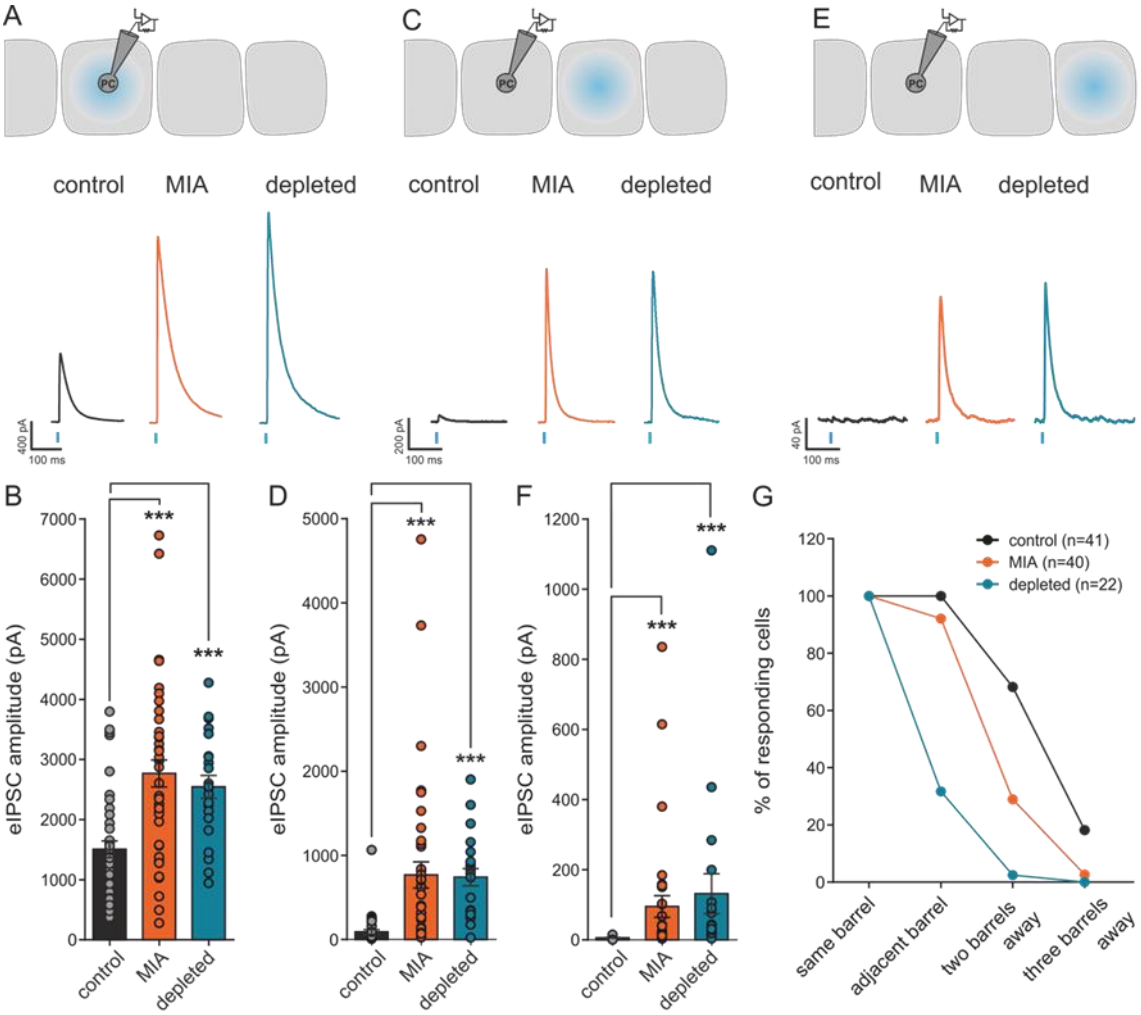


Figure II.3. Maternal immune activation and *in utero* microglia depletion enhance inter-barrel inhibition in the cortex of juvenile mice. Representative traces of population IPSCs evoked in single PC by blue light stimulation of ChR2-expressing PV interneurons of the same (**A**), of the adjacent (**C**) and of the next adjacent (**E**) barrels in $PV^{cre/+}::Ai32^{lox/+}$ P20-25 mice as illustrated on the drawings. Comparison of the light-evoked IPSCs in the same (**B**), adjacent (**D**) and next adjacent (**F**) barrels in the three experimental conditions (Kruskal Wallis tests, same barrel: $p < 0.0001$; adjacent barrel: $p < 0.0001$; control: N = 18, n = 41; MIA: N = 13, n = 40; depleted: N = 5, n = 22. For the next adjacent barrel, only cells displaying responses in the adjacent barrel were recorded: $p < 0.0001$; N = 11, n = 16; MIA: N = 13, n = 34; depleted: N = 5, n = 20). l, Percentage of PC responding to the optogenetic stimulation of the different barrels in control and prenatal MIA or microglia-depleted mice.

Consistent with the larger amplitude of intra-barrel unitary synaptic responses (see above), the inhibition evoked by the optogenetic stimulation of same barrel was larger in microglia depleted and MIA mice (**Fig. II.3A and 3D**). However, the inhibition from the adjacent barrel or from the next adjacent barrel was also much larger in these animals (**Fig. II.3B-F**). This stronger horizontal inhibition was partly due to a higher functional connectivity between adjacent barrels (**Fig. II.3G**).

Finally, we used voltage sensitive dye to visualize cortical activity within the barrel field of anesthetized mice in real time after whisker stimulation (**Fig. II.4A**, (Borgdorff *et al.*, 2007)). In control conditions, C2 whisker stimulation evoked first a signal in the C2 column that then propagates within the whole barrel field. However, while the response latency in the C2 column appeared similar in all groups, albeit a bit shifted, MIA or *in utero* microglia depletion led to a decreased lateral propagation of the signal (**Fig. II.4B-C**).

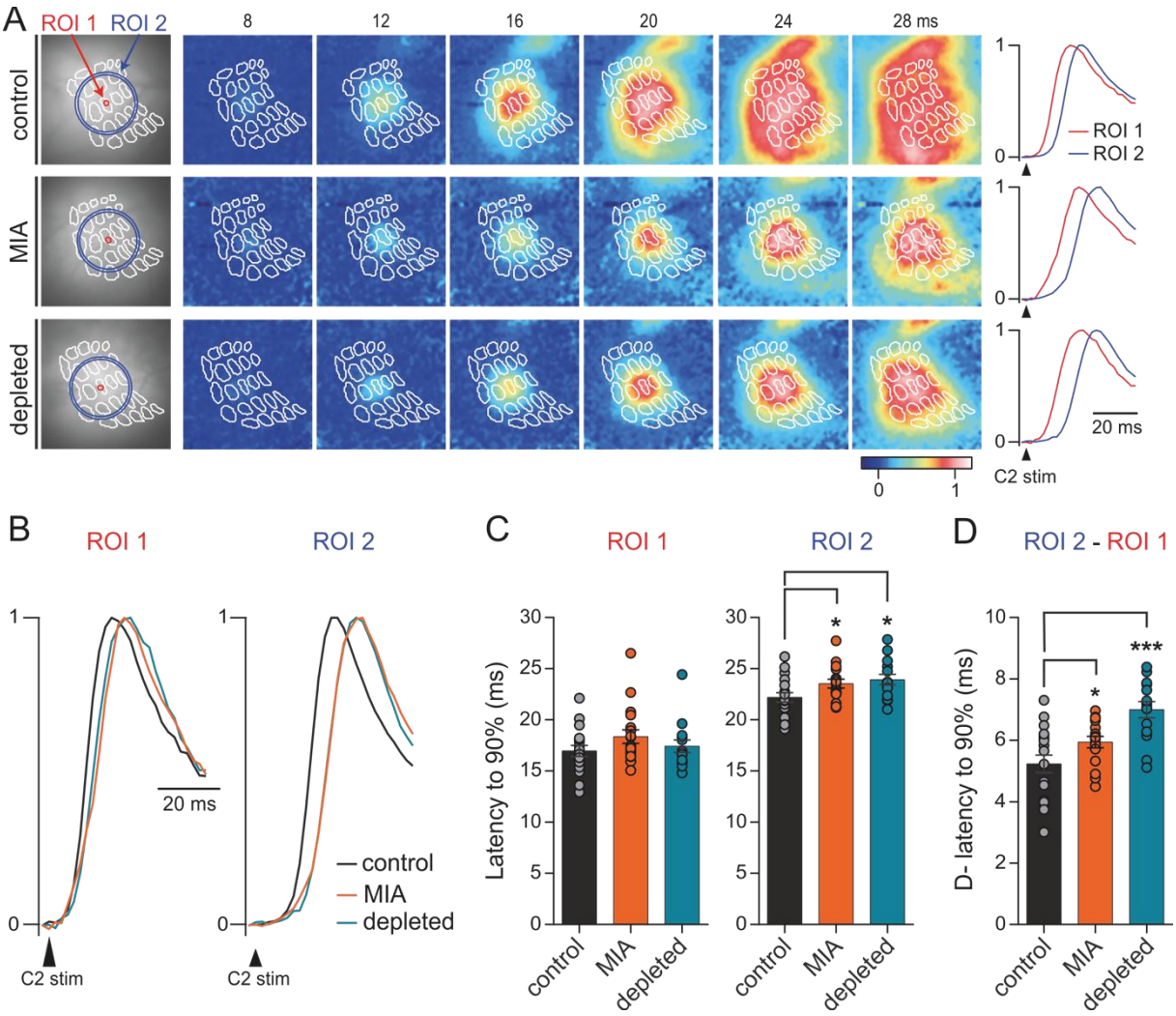


Figure II.4. Maternal immune activation and *in utero* microglia depletion retard lateral spread of sensory information *in vivo*. A, Spatio-temporal dynamics of membrane potential changes imaged using voltage-sensitive dye (VSD) in anesthetized control, MIA and depleted animals after a brief deflection of the central C2 whisker. The snapshots display the averaged fluorescence signal (n = 20 trials) for a representative case at six different timings relative to the time of deflection of the C2 whisker. The barrel map reconstructed from a *post hoc* cytochrome oxidase staining and overlaid onto the VSD signals is shown as white outlines. C2 deflection evokes a rapid localized depolarization limited to the C2 cortical barrel column and over the next milliseconds, the depolarization spreads across the barrel field. We chose to follow the spread of the sensory responses in two different defined areas (ROI 1 and ROI 2, represented by the red and blue circle respectively). **B**, Percentage of the response among control, MIA and depleted mice, following C2 whisker deflection in ROI 1 and ROI 2. **C**, Latencies to 90% of the peak response for each ROI in control, MIA and depleted mice. **D**, Differences of latencies between ROI 2 and ROI 1 for control, MIA and depleted mice.

Discussion

Our work reveals key roles for immune cells during the normal assembly of cortical circuits and provides novel insights onto how microglia dysfunction or immune risks lead to pathological brain wiring. Specifically, we report that both MIA and embryonic microglia depletion induced a decreased PV cell-mediated inhibition in adult offspring. Surprisingly though, this is preceded by a transient increase of the number of PV cells and of the functional connectivity of these inhibitory interneurons before weaning of the offspring.

The hypothesis of a dysfunctional network in the adult brain of patients or animal models of neurodevelopmental psychiatric disorders is widely accepted, but relies mostly on histological examination of cerebral samples and rarely on specific functional analysis of these cells (Nelson and Valakh, 2015). Our data on adult offspring after MIA are, however, in good agreement with a previous study using another model of MIA (Poly:IC injection at E9) reporting lower inhibitory transmission from PV cells without modifications in the number of PV cells (Canetta *et al.*, 2016). A downregulation of GAD67 expression in PV cells could explain this effect (Curley *et al.*, 2011 ; Hashimoto *et al.*, 2003).

At earlier stages of postnatal development (*i.e.* P20), MIA and prenatal microglia depletion led to an increased number of PV cells in the barrel cortex. We previously showed that the same manipulations induce a premature entry of future PV interneurons in the cortical plate at late embryonic stages and later lead to a defect in laminar positioning at early postnatal stages (Squarzoni *et al.*, 2014). It is not yet clear though whether the excess in PV cells at P20 results solely from these earlier perturbations or are also influenced by long-lasting changes in the phenotype of microglia. Indeed, MIA induced by Poly(I:C) injection at E15 induces long lasting changes in microglial transcriptome together with an impaired phagocytic activity in

adult offspring (2017). On the other hand, impairment of glutamatergic synaptic function in the adult hippocampus induced by prenatal microglia activation (including LPS-induced MIA) has been shown to rely exclusively on changes induced before birth (Roumier *et al.*, 2008). Future studies should investigate whether postnatal manipulation of microglia can rescue the phenotype of PV connectivity after MIA.

Beside this increase in PV numbers at P20, we also observed a twofold enhancement of the strength of unitary connections made by single PV cells onto principal neurons of the barrels. At this stage, it remains unclear whether pre- or/and post-synaptic changes are responsible for this remarkable increase but preliminary analysis points toward an increase in the number of functional synaptic sites per unitary connection and a slight but consistent increase in release probability. Interestingly, we also observed an aberrant horizontal connectivity of PV cells across adjacent barrels. Axonal arborization of most FS-PV cells is usually confined to the home-barrel or the home-cortical column (vertical extension above and below the barrel), with the exception of large basket cells that have also inter-barrel projections and of another FS subtype with soma and projections restricted to the barrel hollow (Koelbl *et al.*, 2015 ; Li and Huntsman, 2014 ; Rudy *et al.*, 2011 ; Shigematsu *et al.*, 2018). Accordingly, optogenetic stimulation of PV cells of a single barrel triggers a very limited horizontal inhibition in adjacent barrels (**Fig. II.3**). The large increase in functional horizontal connectivity of PV cells after MIA and prenatal microglia depletion is therefore striking and suggests a major dysregulation in the control of axonal growth or in the pruning of supernumerary branches. We do not know still whether this possible aberrant sprouting of PV axons is affecting all types of PV cells or only those that display horizontal projections in control conditions (Li and Huntsman, 2014).

PV cells are important determinant of the excitation/inhibition (E/I) balance in the cortex and this balance is strongly regulated by homeostatic plasticity (Nelson and Valakh, 2015). The existence of these homeostatic regulations of the cortical network makes it difficult to identify the temporal sequence of events that actually leads to E/I imbalance, as it has been repeatedly reported in models of psychiatric diseases (Nelson and Valakh, 2015). Interestingly, Roumier *et al.* (2008) previously reported that prenatal activation of microglia (including by LPS-induced MIA) leads to an early and long-lasting increase in excitatory glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. If the same holds true for the development of the barrel cortex, our observation of an increased PV-mediated functional inhibition could in theory result from a homeostatic adaptation to this increased excitation. Although we have not tested directly this hypothesis, our *in vivo* recordings indicating a deficit in the propagation of

sensory information in the barrel cortex suggest that an excess of inhibition at the input stage of the cortex imposes a strong brake on the integration of sensory inputs, hence suggesting that E/I balance is dysregulated, at least during this time window of increased functional inhibition of the PV network. Similarly, the decreased inhibition observed in the adult offspring could also result from an excessive, misadjusted homeostatic compensation of the large excess of inhibition we observed in juvenile mice.

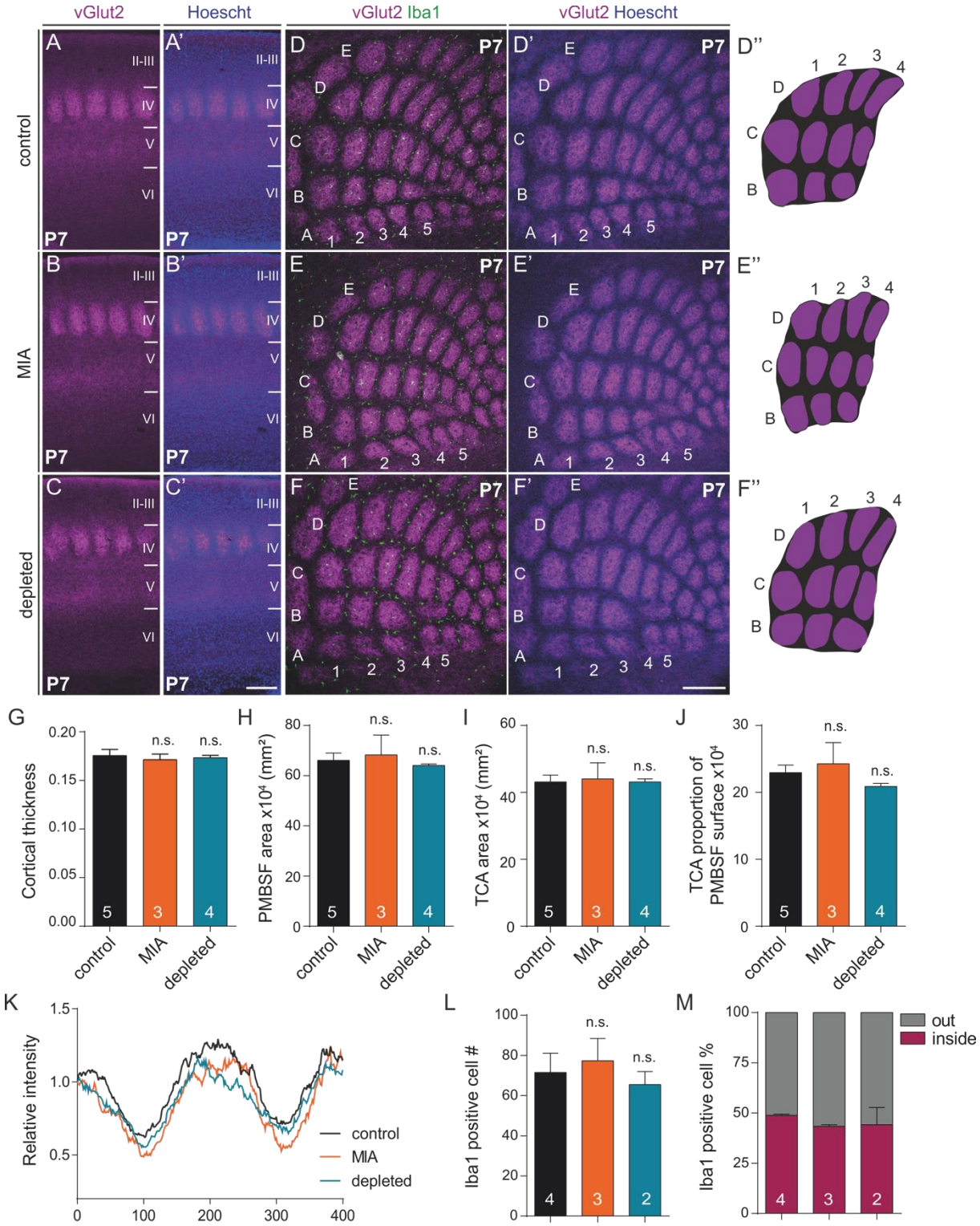
The phenotype we observed on PV functional connectivity is remarkably similar in MIA and in microglia depleted offspring. This strongly suggests that abnormal development of PV cells in MIA results from the impossibility for microglia to fulfill their physiological functions once activated by MIA. It is interesting to note, however, that this is not always the case and that in similar or identical MIA models, prenatal depletion of microglia results in changes that are opposite to those induced by MIA, such as in the case of the control of dopaminergic axon outgrowth (Squarzoni *et al.*, 2014) and of the regulation of neural precursor cells in the developing neocortex (Cunningham *et al.*, 2013). These contrasting results stress the diversity of microglia functions that are exquisitely regulated and determined by their environment in pathological conditions and during normal development (Mosser *et al.*, 2017 ; Thion and Garel, 2017).

In conclusion, our results reveal that defects in cortical inhibition observed in adult offspring after MIA result from a complex set of events that includes an unexpected and large excess of cortical inhibition by PV cells. These observations also strongly support a role of microglia in this impaired development of cortical circuits and shed a new light on how microglia and prenatal immune challenges can impact the functional wiring of the brain in psychiatric disorders.

Acknowledgments

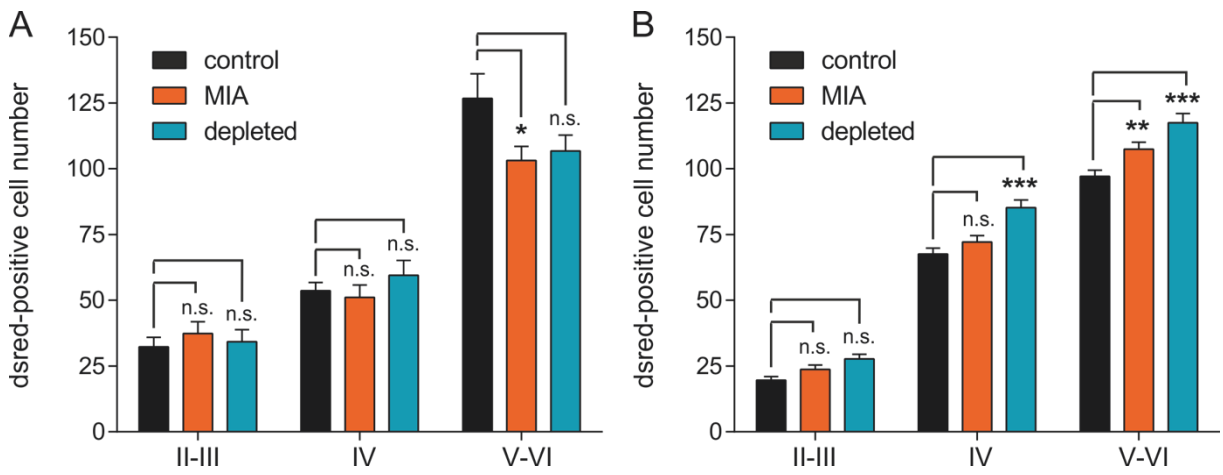
We are grateful to members of the Garel and Audinat labs for discussions and critical comments on the manuscript. We thank the IBENS Imaging Facility (France BioImaging, supported by ANR-10-INBS-04, ANR-10-LABX-54 MEMO LIFE and ANR-11-IDEX-000-02 PSL* Reseach University, “Investments for the future”). Audinat lab was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM: DEQ20140329488). C-A. Mosser was supported by the Région Île-de-France (DIM Cerveau et Pensée) and by the FRM (FDT20170739030). We are grateful to A. David, M. Omnes, C. Auger, A. Delecourt, E. Touzalin, D. Valera and C. Le Moal for excellent technical assistance.

Supplementary figures



Supplementary figure II.S.1. *In utero* microglia depletion and maternal immune activation do not affect barrels formation in the primary somatosensory cortex. A-C', Coronal sections through the posterior medial barrel subfield (PMBSF) of the primary somatosensory cortex of control, MIA

and microglia depleted P7 mice stained with vGlut2 antibodies to label thalamocortical afferences and with Hoechst to label cell nuclei. **D-F',** Tangential sections through the barrel field of control, MIA and depleted P7 mice immunostained with vGlut2, the microglia marker Iba1 and with Hoechst. **D''-F''**, Reconstructions of the PMBSF in control, MIA and depleted P7 mice and showing no significant changes among the three conditions. **G-J**, Quantifications of the cortical thickness (**G**), the PMBSF area (**H**), the TCA area (**I**) and the proportion of TCA overs PMBSF surfaces (**J**) in control, MIA and depleted P7 mice. **K**, Relative fluorescence intensity across the C2 barrel. **L-M**, Number of microglial cells within the barrel field (**L**) and the proportion of these cells located inside or outside the barrels (**M)** among control, MIA and depleted P7 mice.



Supplementary figure II.S.2. *In utero* microglia depletion and maternal immune activation impair the laminar positioning of PV interneurons in young animal but not in the adults. A, Comparison of PV interneurons numbers within cortical upper (II-III), IV and deep (V-VI) layers between controls, MIA and depleted P60 mice (control: N = 10, MIA: N = 6, depleted: N = 4) and **B**, P20 mice (control: N = 13, MIA: N = 17, depleted: N = 13).

References

Beumer W, Gibney SM, Drexhage RC, Pont-Lezica L, Doorduin J, Klein HC, Steiner J, Connor TJ, et al. (2012), The immune theory of psychiatric diseases: a key role for activated microglia and circulating monocytes. J Leukoc Biol 92:959-975.

Borgdorff AJ, Poulet JF, Petersen CC (2007), Facilitating sensory responses in developing mouse somatosensory barrel cortex. J Neurophysiol 97:2992-3003.

Butt SJB, Stacey JA, Teramoto Y, Vagnoni C (2017), A role for GABAergic interneuron diversity in circuit development and plasticity of the neonatal cerebral cortex. Current Opinion in Neurobiology 43:149-155.

Canetta S, Bolkan S, Padilla-Coreano N, Song LJ, Sahn R, Harrison NL, Gordon JA, Brown A, et al. (2016), Maternal immune activation leads to selective functional deficits in offspring parvalbumin interneurons. Molecular Psychiatry 21:956-968.

Choi GB, Yim YS, Wong H, Kim S, Kim H, Kim SV, Hoeffer CA, Littman DR, et al. (2016), The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. Science 351:933-939.

Cunningham CL, Martinez-Cerdeno V, Noctor SC (2013), Microglia Regulate the Number of Neural Precursor Cells in the Developing Cerebral Cortex. Journal of Neuroscience 33:4216-4233.

Curley AA, Arion D, Volk DW, Asafu-Adjei JK, Sampson AR, Fish KN, Lewis DA (2011), Cortical deficits of glutamic acid decarboxylase 67 expression in schizophrenia: clinical, protein, and cell type-specific features. Am J Psychiatry 168:921-929.

Hanamsagar R, Bilbo SD (2017), Environment matters: microglia function and dysfunction in a changing world. Current Opinion in Neurobiology 47:146-155.

Hashimoto T, Volk DW, Eggan SM, Mirnics K, Pierri JN, Sun Z, R. SA, Lewis DA (2003), Gene Expression Deficits in a Subclass of GABA Neurons in the Prefrontal Cortex of Subjects with Schizophrenia. J Neurosci 23:6315-6326.

Hensch TK (2005), Critical period plasticity in local cortical circuits. Nat Rev Neurosci 6:877-888.

Hippenmeyer S, Vrieseling E, Sigrist M, Portmann T, Laengle C, Ladle DR, Arber S (2005), A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. PLoS Biol 3:e159.

Jacob V, Estebanez L, Le Cam J, Tiercelin JY, Parra P, Paresys G, Shulz DE (2010), The Matrix: a new tool for probing the whisker-to-barrel system with natural stimuli. J Neurosci Methods 189:65-74.

Koelbl C, Helmstaedter M, Lübke J, Feldmeyer D (2015), A Barrel-Related Interneuron in Layer 4 of Rat Somatosensory Cortex with a High Intrabarrel Connectivity. Cerebral Cortex 25:713-725.

Li P, Huntsman MM (2014), Two functional inhibitory circuits are comprised of a heterogeneous population of fast-spiking cortical interneurons. Neuroscience 265:60-71.

Mattei D, Ivanov A, Ferrai C, Jordan P, Guneykaya D, Buonfiglioli A, Schaafsma W, Przanowski P, et al. (2017), Maternal immune activation results in complex microglial transcriptome signature in the adult offspring that is reversed by minocycline treatment. Transl Psychiatry 7:e1120.

Mosser C-A, Baptista S, Arnoux I, Audinat E (2017), Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future. Progress in Neurobiology 149-150:1-20.

Nelson SB, Valakh V (2015), Excitatory/Inhibitory Balance and Circuit Homeostasis in Autism Spectrum Disorders. Neuron 87:684-698.

Patterson PH (2011), Maternal infection and immune involvement in autism. Trends Mol Med 17:389-394.

Roumier A, Pascual O, Béchade C, Wakselman S, Poncer J-C, Réal E, Triller A, Bessis A (2008), Prenatal Activation of Microglia Induces Delayed Impairment of Glutamatergic Synaptic Function. PLoS ONE 3:e2595.

Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J (2011), Three Groups of Interneurons Account for Nearly 100% of Neocortical GABAergic Neurons. Developmental neurobiology 71:45-61.

Shigematsu N, Nishi A, Fukuda T (2018), Gap Junctions Interconnect Different Subtypes of Parvalbumin-Positive Interneurons in Barrels and Septa with Connectivity Unique to Each Subtype. Cerebral Cortex.

Smolders S, Kessels S, Smolders SM-T, Poulhes F, Zelphati O, Sapet C, Brône B (2018), Magnetofection is superior to other chemical transfection methods in a microglial cell line. Journal of Neuroscience Methods 293:169-173.

Squarzoni P, Oller G, Hoeffel G, Pont-Lezica L, Rostaing P, Low D, Bessis A, Ginhoux F, et al. (2014), Microglia modulate wiring of the embryonic forebrain. Cell Reports 8:1271-1279.

Squarzoni P, Oller G, Hoeffel G, Pont-Lezica L, Rostaing P, Low D, Bessis A, Ginhoux F, et al. (2014), Microglia modulate wiring of the embryonic forebrain. Cell Rep 8:1271-1279.

Thion MS, Garel S (2017), On place and time: microglia in embryonic and perinatal brain development. Current Opinion in Neurobiology 47:121-130.

Waisman A, Ginhoux F, Greter M, Bruttger J (2015), Homeostasis of Microglia in the Adult Brain: Review of Novel Microglia Depletion Systems. Trends Immunol 36:625-636.

Chapitre 3

Discussion générale et perspectives

Le rôle fondamental des cellules microgliales au cours du développement est aujourd'hui reconnu, grâce aux découvertes de plusieurs fonctions microgliales impliquées dans de nombreux processus de genèse des circuits neuronaux et synaptiques. Ce travail de thèse avait pour but de mieux comprendre l'influence des cellules microgliales sur la maturation des réseaux corticaux excitateurs, d'examiner leur rôle dans le développement de l'inhibition et d'identifier les mécanismes responsables de cette régulation microgliale. Nous avons également exploré les conséquences à court et long termes d'une perturbation microgliale prénatale sur la connectivité corticale inhibitrice. Dans cet ultime chapitre, je discuterai les données obtenues au regard de l'état actuel des connaissances dans ce domaine, en expansion depuis quelques années.

I. Développement postnatal, microglie et BDNF

1. La microglie représente l'unique source de BDNF nécessaire à la maturation fonctionnelle de la synapse thalamocorticale excitatrice

Nos résultats ont permis d'identifier la signalisation microgliale responsable de la maturation synaptique de la voie thalamocorticale au cours du développement postnatal, et d'appréhender les conséquences de ces interactions développementales microglie-neurones sur la connectivité corticale adulte. Bien que les neurones soient la source majeure de BDNF dans le cerveau (Rauskolb *et al.* 2015), il a été montré que les cellules gliales, dont la microglie, sont également capables d'en produire. L'inactivation conditionnelle du BDNF microglial nous a permis de montrer que la microglie était a priori la seule source de BDNF à la synapse thalamocorticale. En effet, nos données reproduisent l'effet observé chez les souris ayant une perte constitutive du BDNF dans tous les types cellulaires (**Fig. III.2**, (Itami *et al.* 2003)). En outre, chez les souris $CX3CR1^{CreER/+}::BDNF^{loxlox}$ d'un mois, le ratio AMPA/NMDA est de l'ordre de grandeur du ratio immature mesuré à P9-12, ce qui indique qu'aucune source de BDNF ne puisse compenser cette absence de maturation. De façon intéressante, nos données préliminaires montrent également une altération du ratio AMPA/NMDA à la synapse thalamocorticale excitatrice chez les animaux $CX3CR1^{CreER/+}::BDNF^{lox/+}$ n'exprimant qu'un allèle *BDNF* fonctionnel dans la microglie (**Fig. III.1**), tout comme cela avait été observé avec les animaux hétérozygotes $BDNF^{+/-}$ du KO constitutif ((Itami *et al.*, 2003) **Fig. III.2)**. Ces observations suggèrent que la quantité de BDNF libéré est relativement faible puisque la délétion d'un seul allèle est suffisante pour produire le phénotype.

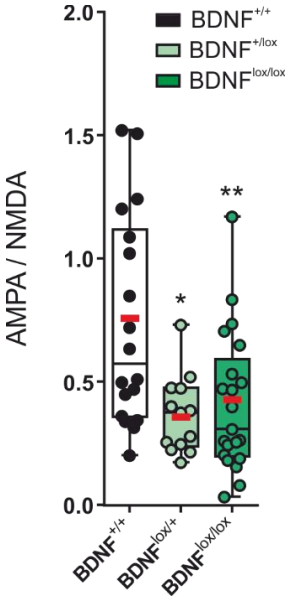


Figure III.1. Le défaut de maturation fonctionnelle de la synapse thalamocorticale excitatrice résultant de l'absence de BDNF microglial est retrouvé chez les souris n'ayant qu'un allèle BDNF fonctionnel dans leurs cellules microgliales. Comparaison du ratio AMPA/NMDA à P9-12 entre les souris *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{+/+}$, *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{lox/+}$ et *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{lox/lox}$ (Kruskal-Wallis statistic, p = 0.010, *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{+/+}$: N = 8, n = 18 ; *CX3CR1*$^{CreER/+}$*:: BDNF*$^{lox/+}$: N = 10, n = 21 ; *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{lox/lox}$: N = 5, n = 13, Dunn's multiple comparisons test). La moyenne est en rouge, la boîte délimite les 25e et 75e percentile, la ligne représente la médiane.

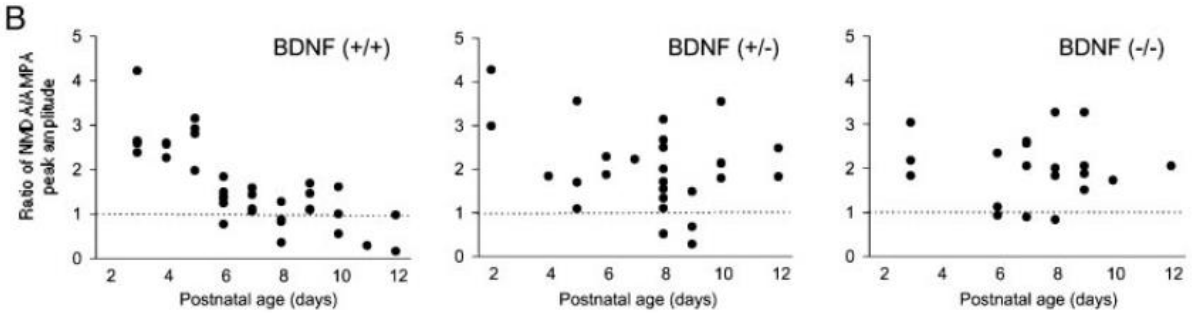


Figure III.2. Ratio NMDA/AMPA en fonction de l'âge chez les souris BDNF$^{+/+}$, BDNF$^{+/-}$ et BDNF$^{-/-}$ (Itami *et al.* 2007).

La libération locale de BDNF par la microglie semble donc nécessaire à la maturation fonctionnelle des synapses thalamocorticales excitatrices et il serait intéressant de tester si le phénotype « sauvage » peut être restauré chez des animaux *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{lox/lox}$ après application d'un agoniste du récepteur TrKB.

2. Effets postsynaptiques du BDNF microglial au niveau des connexions thalamocorticales excitatrices sur les PCs

Pour élucider les mécanismes synaptiques spécifiquement influencés par le BDNF microglial au niveau de la synapse thalamocorticale excitatrice, il serait intéressant d'étudier la composition des récepteurs AMPA et NMDA exprimés par les PCs (en admettant que le BDNF microglial agisse directement sur ces synapses, sans intermédiaire).

L'excitation thalamique des cellules excitatrices est majoritairement dépendante des NMDARs vers P10, dont la maturation fonctionnelle passe par un changement des sous-unités (Lu *et al.* 2001). Nous pourrions supposer que les cellules microgliales sont impliquées dans ce processus, car l'absence de la signalisation fractalkine/CX3CR1 retarde la transition des sous-unités GluN2B à GluN2A (Hoshiko *et al.* 2012). Cependant, le temps de décroissance de la composante NMDA des EPSCs évoqués dans les PC entre P9 et P12 ne semble pas modifié par l'absence de BDNF (*CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{+/+}$: 170.9 ± 63.1 vs *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{lox/lox}$: 197.3 ± 38.8. Moyenne ± SEM). Cette observation est étonnante au regard des données précédentes du laboratoire sur les animaux CX3CR1 KO (Hoshiko *et al.* 2012). Nos résultats suggèrent donc que le BNDF microglial n'influence pas ces propriétés postsynaptiques, et il faudrait tester l'implication éventuel d'un autre facteur microglial, comme le TNFα par exemple, qui a est connu pour ses rôles de modulation de l'expression synaptique des AMPARs et NMDARs (Beattie *et al.*, 2002 ; Stellwagen *et al.*, 2005). Une autre possibilité est que le déficit observé chez les animaux CX3CR1 KO repose un défaut de signalisation, indépendant du retard de migration de la microglie

3. Mécanismes sous-tendant la régulation de la balance excitation/inhibition par le BDNF microglial

Nous avons démontré une régulation microgliale de la maturation de l'inhibition *feedforward* disynaptique à travers la sécrétion de BDNF. Pour mieux comprendre cette modulation développementale, il est nécessaire d'identifier à quelle synapse de la voie thalamocorticale le BDNF microglial est requis. Ce retard développemental du ratio $GABA_A$/AMPA mesuré dans les neurones principaux de la L4 peut être la conséquence i) d'une réduction de l'entrée thalamocorticale aux interneurones responsables de l'inhibition *feedforward*, principalement FS (Koelbl *et al.* 2015 ; Rudy *et al.* 2011), ii) d'un changement de l'excitabilité de ces interneurones FS, d'une réduction de la force synaptique aux connexions FS-PC intracorticales, ou iii) d'une combinaison de plusieurs de ces effets.

Les études du KO BDNF constitutif ont rapporté que ce facteur neurotrophique était critique pour l'établissement de l'excitabilité des interneurones FS (Itami *et al.*, 2007). En effet, la maturation des propriétés intrinsèques et immunohistochimiques de ces interneurones survient vers la fin de la 2ème semaine postnatale, et en absence de BDNF, l'établissement de ces propriétés adultes est retardé. L'absence de BDNF se manifeste notamment par la présence de cellules aux propriétés immatures, présentant de forts courants I_h (*hyperpolarization-activated*

current), un courant ayant une influence dépolarisante. Ces données ne coïncident pas avec la baisse de l'excitabilité qui pourrait expliquer nos observations, il est donc peu probable que l'absence de transmission inhibitrice *feedforward* s'explique par un défaut d'excitabilité des interneurones FS.

L'émergence de l'inhibition *feedforward* des PCs de la couche 4 est dépendante de l'expérience sensorielle, et est la conséquence d'un renforcement de la neurotransmission thalamocorticale sur les interneurones FS des tonneaux (Chittajallu and Isaac, 2010). La privation sensorielle (vibrisse rasées) empêche en effet le développement de l'entrée excitatrice mature des cellules inhibitrices. Dans le cortex adulte, il a été montré que la libération de BDNF se fait dépend de l'activité (Balkowiec and Katz, 2000). Les prolongements microgliaux étant très mobiles et attirés par l'activité neuronale (Li *et al.*, 2012 ; Sipe *et al.* 2016 ; Tremblay *et al.* 2010 ; Wake *et al.* 2009), on pourrait postuler que la libération de BDNF microglial aux connexions thalamocorticales est déclenchée par la transmission excitatrice à la synapse entre afférences thalamiques et interneurones FS, et influence par la suite la maturation des ces synapses.

Cependant, nos données préliminaires concernant les propriétés synaptiques des réponses évoquées dans les interneurones FS de souris P9-11 contrôles et $CX3CR1^{CreER/+}::BDNF^{lox/lox}$ par la stimulation minimale dans le VB ne nous permettent pas pour le moment de confirmer cette hypothèse (**Fig. III.3**). En effet, la suppression du BDNF microglial ne semble pas influencer l'amplitude moyenne des EPSCs thalamocorticaux évoqués (**Fig. III.3B-C)**, toutefois la distribution de ces amplitudes est significativement différente entre les souris $CX3CR1^{CreER/+}::BDNF^{+/+}$ et les $CX3CR1^{CreER/+}::BDNF^{lox/lox}$ (**Fig. III.3D**). Cependant, ce résultat est probablement dû au faible nombre de cellules enregistrées chez les animaux KO. De façon intéressante, il semble que l'élimination du BNDF microglial induit une augmentation du *paired-pulse ratio* (PPR ; **Fig. IV.3G**) des réponses évoquées, ce qui indique une modification des propriétés présynaptique, et dans ce cas précis, une diminution de la probabilité de libération à cette synapse par rapport aux contrôles. Cependant, plus d'expériences sont nécessaires pour évaluer de manière fiable la contribution du BDNF microglial à cette synapse. Si nos données ne permettent pas de valider cette hypothèse, il faudra alors vérifier si les connexions GABAergiques unitaires entre interneurone FS et PC sont fonctionnelles en absence de BDNF microglial.

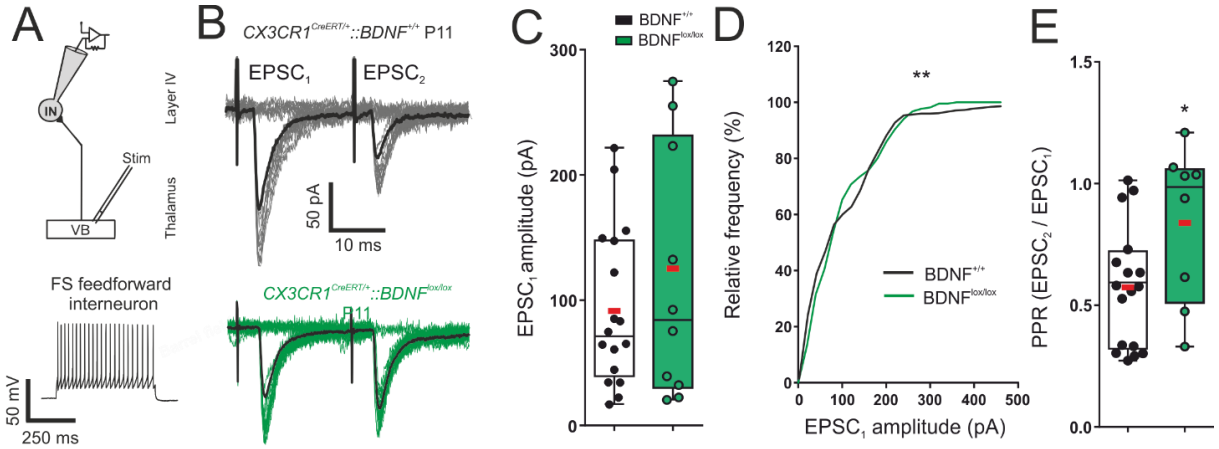


Figure III.3. L'absence de BDNF microglial entraine des modifications de la plasticité à court terme à la synapse thalamocorticale sur les interneurones FS. A, Schéma représentant l'enregistrement des réponses AMPA monosynaptiques évoquées dans les interneurones FS de la L4 par la stimulation minimale du thalamus ventrobasal. Les interneurones FS (IN) furent sélectionnés selon leur profil de décharge, comme le montre cet exemple de trace (train de potentiel d'actions en réponse à une injection de 300 pA), c'est-à-dire des trains de PA ne montrant qu'une très faible adaptation fréquentielle (≤0.7), une fréquence de décharge élevée et de larges et rapides AHP (*after hyperpolarisation*). **B**, Traces représentatives des EPSCs thalamocorticaux évoqués par deux stimulations minimales appariées (50 Hz toutes les 20 secondes) dans les interneurones FS de souris *CX3CR1$^{CreER/+}$::BDNF$^{+/+}$* (traces du haut, en gris, avec la trace moyenne en noir) et *CX3CR1$^{CreER/+}$::BDNF$^{lox/lox}$* (traces du bas en vert) P11. **C**, Amplitude de l'EPSC$_1$ (p=0.51). **D**, Distributions cumulatives des amplitudes (Kolmogorov-Smirnov D test, p = 0.0016). **E**, *Paired-pulse* ratio (EPSC$_2$/EPSC$_1$; p = 0.048). *CX3CR1$^{CreER/+}$::BDNF$^{+/+}$* : N = 6, n = 19 ; *CX3CR1$^{CreER/+}$::BDNF$^{lox/lox}$* : N = 4, n = 10 ; Tests two-tailed Mann-Whitney U (sauf quand le test est précisé).

4. Conséquences de l'absence de BDNF microglial au long terme sur la transmission thalamocorticale

Chez les animaux d'1 mois dont la microglie ne produit plus de BDNF à partir des stades postnatals précoces, les voies thalamocorticales mono- et disynaptiques sont altérées de façon différente. A la synapse excitatrice entre thalamus et PCs le ratio AMPA/NMDA est immature, et l'inhibition disynaptique est exacerbée. Cette observation est très surprenante, car elle va à l'encontre de l'hypothèse selon laquelle un mécanisme homéostasique déclencherait une augmentation de l'inhibition pour compenser une augmentation de l'excitation afin de maintenir la balance E/I. En effet, au début de la deuxième semaine postnatale, en même temps qu'émerge l'inhibition par *feedforward*, la connectivité du réseau excitateur des PCs augmente de façon soutenue, de façon concomitante avec une forte période de formation d'épines dendritiques (Ashby and Isaac). Ce développement rapide de l'excitation est contrebalancé par une augmentation correspondante de l'inhibition

feedforward afin de maintenir l'excitabilité du réseau à un niveau constant. Par conséquent, on peut supposer que c'est justement ce mécanisme permettant la stabilité de l'équilibre E/I qui est atteint. Une autre possibilité est qu'en absence de BDNF, l'excitation thalamique se développe, mais les interneurones FS restent immatures, et sont donc plus excitables, ce qui induit une augmentation de l'inhibition *feedforward*.

5. Implication du BDNF microglial dans l'expression de la plasticité à long terme

Le stade développemental correspondant à l'intervalle temporel que nous avons choisi pour étudier la modulation des cellules microgliales sur la maturation fonctionnelle est celui de la fermeture de la période critique de plasticité synaptique, la LTP ne pouvant plus être induite aux synapses thalamocorticales après le 10ème jour postnatal. Lu et ses collègues ont montré que la fermeture de cette fenêtre coïncidait, mais sans lien de causalité, avec le changement d'expression des sous-unités des NMDARs (Daw *et al.* 2007 ; Lu *et al.* 2001). Dans la mesure où nous avons précédemment montré que la microglie contrôle ce changement de sous-unité (Hoshiko *et al.* 2012), il serait intéressant d'explorer si les cellules microgliales sont également impliquées dans la fermeture de la période critique d'induction de la LTP. En effet, cela permettrait de révéler un mécanisme commun en amont de ces deux processus, pouvant expliquer leur corrélation temporelle.

On pourrait également tester un rôle du BDNF microglial dans ce processus, en vérifiant si l'induction de la LTP est modifiée chez les animaux *CX3CR1*$^{CreER/+}$*::BDNF*$^{lox/lox}$ par rapport aux contrôles. L'induction de la LTP permet de convertir les synapses silencieuses ne contenant que des NMDARs en synapses pouvant exprimer des AMPARs, processus appelé l' « *unsilencing* ». Si le BDNF microglial est responsable de cet *unsilencing*, comme l'ont montré Itami et collaborateurs chez le KO BDNF constitutif (Itami *et al.* 2013), on peut supposer que cette conversion des synapses participe à l'augmentation du ratio AMPA/NMDA et que le BDNF microglial est impliqué dans la LTP.

6. Les astrocytes comme intermédiaires entre microglie et neurones

Les astrocytes, importants représentants de la population gliale, contribuent au maintien des fonctions neuronales *via* de multiples mécanismes. Ils sont notamment connus pour leurs interactions avec les synapses. En favorisant la synaptogénèse, en contribuant à l'élimination des synapses et en modulant la maturation et les fonctions synaptiques, les astrocytes sont devenus des acteurs importants du développement des circuits neuronaux (Clarke and Barres,

2013). Les astrocytes ont la particularité d'exprimer des récepteurs aux facteurs libérés par la microglie et sont également dotés de la possibilité de moduler les fonctions synaptiques par l'intermédiaire de nombreuses voies de signalisation (Araque *et al.*, 2014) et d'élaguer les synapses de manière dépendante de l'activité (Chung *et al.*, 2015).

Les cellules microgliales sont elles aussi capables de moduler les fonctions astrocytaires. Dans l'hippocampe de souris juvénile, la mobilisation des cellules microgliales suivant l'activation de TLR4 induit rapidement une libération d'ATP microglial, qui active les récepteurs P2Y1 purinergiques des astrocytes, potentialisant ainsi la libération de glutamate astrocytaire, qui en retour régule l'activité synaptique aux synapses entre les collatérales de Schaffer et les cellules pyramidales de CA1 (Pascual *et al.* 2012). En outre, une coopération entre microglie et astrocytes a déjà été observée dans le cadre de la libération de TNFα (Santello *et al.*, 2011). Bien que jusqu'à présent, ce genre d'action conjointe de ces deux populations gliales n'ait été rapportée qu'en contexte pathologique (Liddelow *et al.*, 2017 ; Santello *et al.*, 2011), il serait intéressant d'examiner si le phénotype spécifique des cellules microgliales pourraient aussi contrôler indirectement la maturation synaptique par la mobilisation des astrocytes

Dans le cortex somatosensoriel, les astrocytes sont organisés en réseaux au centre des tonneaux, et ce dès la formation des tonneaux (Houades *et al.* 2013). Leur présence au centre des tonneaux laisse donc supposer qu'ils peuvent également influencer le développement des synapses thalamocorticales, ou alors, étant sensibles à l'activité synaptique, ils pourraient moduler les fonctions ou le recrutement de la microglie.

Il a été montré dans le cortex en champ de tonneau que les astrocytes régulent la transmission GABAergique (Benedetti *et al.* 2011). En effet, en interférant avec la signalisation calcique intracellulaire astrocytaire, les auteurs de cette étude ont observé une augmentation de l'excitation des PCs de la L4, et le blocage pharmacologique combiné des $GABA_AR$ et $GABA_BR$ reproduisait cet effet. Cela suggère que le calcium astrocytaire contrôle l'inhibition des interneurones en favorisant la libération de GABA. Les astrocytes se placent donc en candidat idéal d'intermédiaire de la communication microglie-neurone dans notre modèle., même s'il est peu probable que le BDNF n'agisse pas directement au niveau synaptique, étant donné ses fonctions dans la synaptogenèse.

Compte tenu de leur origine différente, les astrocytes et les microglies sont assez susceptibles de jouer des rôles différents, mais il est surprenant de voir à quel point ils contribuent à des

aspects similaires du développement synaptique, et pourraient tous deux avoir un impact potentiel sur les troubles neurodéveloppementaux (Chung *et al.*, 2015).

II. MIA, microglie et maladies neuropsychiatriques

1. Conséquences anatomiques de la MIA et la déplétion embryonnaire chez les jeunes souris

Nos résultats ont révélé une augmentation du nombre d'interneurones PV à P20. Ce niveau anormal d'interneurone pourrait découler directement des perturbations induites durant le développement embryonnaire se répercutant aux stades postnataux ou bien être dû à des modifications persistantes de l'activité microgliale.

Il a déjà été montré que la MIA pouvait induire des défauts fonctionnels prénatals reposant exclusivement sur des modifications induites avant la naissance (Roumier *et al.* 2008). Pour que la connectivité inhibitrice se mette en place de façon adéquate, il faut tout d'abord que les précurseurs d'interneurones inhibiteurs migrent correctement jusqu'à leur emplacement définitif, et la migration des interneurones est dépendante de l'activité (Babij and De Marco Garcia, 2016). Une fois leurs cibles corticales atteintes, ils commencent à acquérir leurs propriétés matures, c'est-à-dire leurs caractéristiques morphologiques, électrophysiologiques et moléculaires. Une fois encore, la formation de contacts avec leurs partenaires dépend des indices environnants et de l'activité (Babij and De Marco Garcia, 2016). Nos collaborateurs ont montré que la MIA comme la déplétion microgliale prénatale induisent une entrée prématurée des futurs interneurones PV dans la plaque corticale aux stades embryonnaires, et perturbent le positionnement de ces interneurones dans les couches corticales pendant le développement postnatal précoce (Squarzoni *et al.* 2014). De façon intéressante, le BDNF, en plus de promouvoir la synaptogenèse et l'extension dendritique, favorise aussi la migration cellulaire (Marín and Rubenstein, 2001). Une modification du taux de BDNF lors du développement peut perturber la migration des interneurones. Or nous avons montré que les cellules microgliales en développement modulent la maturation synaptique corticale *via* la signalisation BDNF. Il est donc possible d'imaginer qu'en l'absence de BDNF microglial, après une déplétion de ces cellules ou à la suite d'une MIA qui les détourneraient de leurs fonctions physiologiques, la migration des interneurones PV soit perturbée.

Des changements irréversibles des fonctions microgliales pourraient aussi expliquer nos données. Il a par exemple été montré qu'une MIA induite à E.15 par injection de Poly:(IC)

entraine des anomalies transcriptomiques dans la microglie ainsi qu'une altération de l'activité phagocytaire chez la progéniture adulte (Mattei *et al.* 2017). Ce détournement de l'activité physiologique des cellules immunitaires du SNC pourrait influencer la maturation des interneurones. En plus de ses fonctions dans l'établissement des circuits corticaux, le BDNF est également essentiel un peu plus tard dans le développement, au moment du renforcement et de l'élagage synaptique, stade critique de la susceptibilité aux maladies psychiatriques (Schmidt and Mirnics). Par conséquent, le maintien de niveaux appropriés de BDNF est essentiel du stade de développement des progéniteurs neuronaux jusqu'à la maturation du cerveau des adolescents. Si les cellules microgliales sont la source de BDNF permettant le développement adéquat des interneurones, les changements de phénotypes microgliaux induits par la MIA, ou la déplétion transitoire microgliale, pourraient expliquer la distribution corticale anormale des interneurones PV à P20.

Toutefois, les conséquences d'une MIA sur les cellules microgliales divergent largement (Smolders *et al.* 2014). De nombreuses études soulèvent des contradictions en termes de nombre/densité, de morphologie, et d'expression de marqueurs ou de facteurs des cellules microgliales. Par exemple, si l'on se penche sur les inductions de MIA par injection de LPS, plusieurs effets très différents ont été rapportés. Par exemple, pour un protocole se rapprochant de celui que nous avons utilisé (une injection IP de LPS à 100µg/kg à E12, *versus* une injection de LPS à 120 µg/kg à E13.5 dans notre cas), une augmentation relative de la proportion des cellules microgliales amiboïdes par rapport aux cellules ramifiées dans l'amygdale a été rapportée à divers stades postnataux (P7, P14 et P40). Ce phénotype s'accompagnait de la surexpression de plusieurs interleukines et du TNFα (O'Loughlin *et al.*, 2017). Un autre groupe a rapporté qu'une MIA induite par une injection IV de LPS (50 µg/kg à E.15) n'avait absolument aucun effet sur la densité microgliale corticale aux stades postnatals (Hsueh *et al.* 2017). Il est donc difficile de prédire les effets de la MIA sur les propriétés microgliales dans notre modèle. Néanmoins, nous n'avons pas observé de modifications postnatales de la densité microgliale dans le cortex somatosensoriel.

Nos données révèlent la répartition spatiale des somas des interneurones PV, mais il serait intéressant d'avoir une aussi une idée de la répartition des arborisations axonales. Nos données préliminaires de remplissage à la neurobiotine des interneurones des tonneaux ne suggèrent pour l'instant qu'une importante variabilité de l'organisation spatiale axonale et dendritique des cellules FS. Des analyses morphologiques plus approfondies sont donc nécessaires.

2. Conséquences fonctionnelles de la MIA et de la déplétion embryonnaire chez les souris juvéniles et adultes

La déplétion et la MIA *in utero* affectent la transmission inhibitrice unitaire à P20 et à P60.En plus de cette augmentation du nombre de cellules PV à P20, nous avons également observé une hausse drastique de la force des connexions unitaires aux synapses FS → PC de la L4, suggérant une augmentation du nombre de boutons synaptiques, de récepteurs postsynaptiques activé, ou bien un défaut d'élagage des connexions. Il faut noter que nos analyses préliminaires indiquent une augmentation du nombre de sites synaptiques fonctionnels par connexion unitaire et une augmentation légère mais constante de la probabilité de libération (**Fig. III.4**). De façon intéressante, ce défaut de libération est retrouvé à P60, mais seulement chez les animaux déplétés, pas après MIA. Il s'agit là de la seule différence que nous ayons observée entre les deux protocoles. Il est cependant très probablement qu'effectivement ces deux protocoles influencent plusieurs processus de façon bien distincte, comme cela a été montré dans la régulation des précurseurs neuronaux durant le développement du néocortex (Cunningham *et al.*, 2013).

De façon surprenante, nous avons aussi découvert une connectivité horizontale aberrante des interneurones PV dans nos deux modèles. L'arborisation axonale de ces interneurones est d'habitude majoritairement confinée à la colonne corticale, voire restreinte au tonneau, contenant le soma (Koelbl *et al.* 2015 ; Rudy *et al.* 2011 ; Shigematsu *et al.* 2018). Après MIA ou déplétion microgliale embryonnaire, les axones des cellules PV semblent largement atteindre plusieurs colonnes corticales. Cette arborisation exubérante semble bien due à une maturation anormale de la morphologie des interneurones puisque nos enregistrements ont été effectués en présence d'antagonistes des récepteurs glutamatergiques afin d'éliminer des effets indirects *via* le réseau excitateur. L'hypothèse la plus probable est donc que la MIA et la déplétion microgliale embryonnaire transitoire entrainent une dérégulation majeure de la croissance axonale ou dans l'élagage des branches surnuméraires.

Il serait intéressant d'étudier plus précisément la sous-population d'interneurones PV touchée par ces altérations. En effet, il a été montré que deux types d'interneurones PV, définit par leur développement durant la neurogenèse, *early*- et *late-born* (naissent entre E9.5-E10.5 et E13.5-E14.5 respectivement) et régulent différentiellement la plasticité sous-tendant l'apprentissage (Donato *et al.* 2015). Les interneurones *early-born* présentent des niveaux d'expression de PV et de GAD67 relativement hauts, ainsi qu'un ratio E/I élevé, alors que les

cellules PV *late-born* expriment peu la PV et GAD67, et sont caractérisés par un rapport E/I bas.

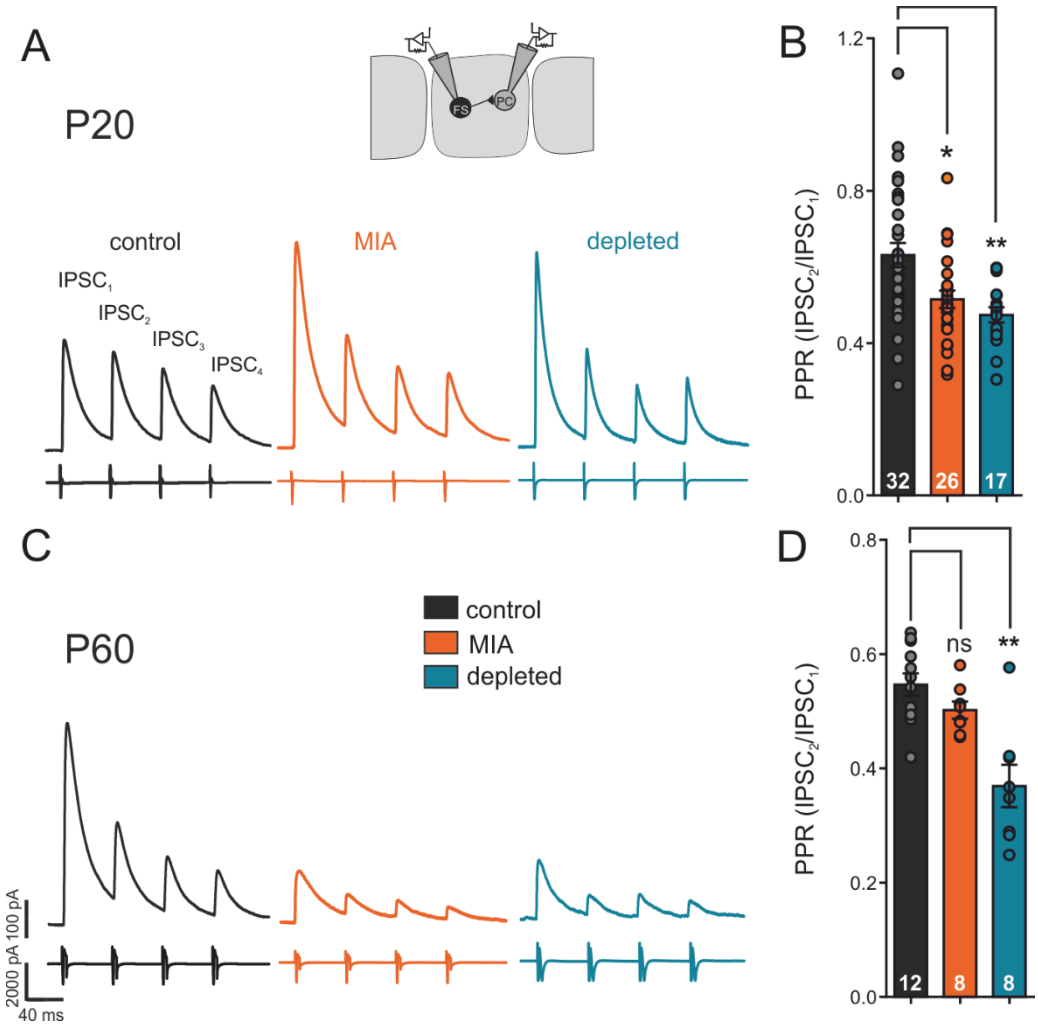


Figure III.4. La MIA et la déplétion microgliale *in utero* semblent affecter les propriétés présynaptiques des synapses inhibitrices entre FS et PC des tonneaux. Représentation schématique de la configuration d'enregistrement. Traces moyennes représentatives des courants postsynaptiques inhibiteurs évoqués par un train de potentiels d'action dans les interneurones FS de tranches coronales à P20 (**A**) ou de tranches thalamocorticales à P60 (**C**) de souris contrôles, MIA ou déplétées. Comparaison des PPR, calculés comme le rapport d'amplitude de l'$EPSC_2/EPSC_1$, entre les souris contrôles, MIA et déplétées à P20 (**B**, Test Kruskal Wallis, p = 0.0011, contrôles : N = 13, n = 32 ; MIA : N = 13, n = 26 ; déplétés : N = 7, n = 17) et à P60 (**D**, Test Kruskal Wallis, p = 0.0024, contrôles : N = 6, n = 12 ; MIA : N = 4, n = 8 ; déplétés : N = 3, n = 8).

Par conséquent, selon les modèles classiques de schizophrénie et d'autisme, ce sont les cellules *early*- et *late-born* qui seraient respectivement impliquées (Donato *et al.* 2015). Selon nos modèles de perturbation prénatale, il serait intéressant d'appréhender si les interneurones PV générés à ce moment-là sont directement influencés par l'inflammation et/ou la microglie,

et d'examiner les éventuelles différences entre MIA et déplétion. En effet, ces deux sous-populations sont probablement affectées quel que soit le traitement, mais puisque nous interagissons avec le système à E13.5 en MIA, il faudrait regarder plus particulièrement les interneurones *late-born*, tandis que pour la déplétion à E6.5, il faudrait peut-être s'intéresser plus précisément aux *early-born*.

3. La MIA et la déplétion embryonnaire induisent-elle un déséquilibre de la balance excitation-inhibition ?

Les interneurones PV sont essentiels à l'établissement et la maintenance de l'équilibre entre excitation et inhibition dans le cortex, et cette balance E/I est étroitement régulée par la plasticité homéostasique (Nelson and Valakh, 2015). Une dérégulation de la balance E/I est suspectée comme responsable des déficiences cognitives observées dans de nombreux TSA et cas de schizophrénie, et est souvent à l'origine de ce déséquilibre un défaut d'inhibition (Kroon *et al.*, 2013). En effet, des anomalies d'expression des transporteurs d'ions chlore NKCC1 et KCC2 a été observé chez des patients atteints de schizophrénie, se manifestant par des ratios NKCC1/KCC2 immatures (Wu and Sun, 2015). De plus, les analyses de tissus *post mortem* et de modèles murins d'autisme rapportent une diminution systématique du nombre d'interneurones PV dans les néocortex (Gogolla *et al.*, 2009), ce qui a dernièrement été corroboré par certaines données. Par exemple, une MIA induite par injection de poly:(IC) à E12.5 entraine l'apparition de « patches corticaux », caractérisés par une cytoarchitecture corticale désorganisée dès le développement embryonnaire, et retrouvée chez l'adulte (Yim *et al.* 2017). Ce phénotype cortical s'accompagne d'une perte de marqueurs spécifiques des couches corticales, ainsi que d'une diminution du nombre d'interneurones PV dans ces « patches » localisé dans le cortex somatosensoriel primaire. Ces anomalies anatomiques sont associées à la réduction de la fréquence des mIPSCs, suggérant des déficits présynaptiques, et en parallèle à une augmentation du nombre de neurones de S1 exprimant cfos, un marqueur d'activité neuronale. De façon intéressante, Yim et collaborateurs ont montré que la taille des patchs est corrélée avec la gravité des phénotypes comportementaux induits par leur protocole de MIA. En effet, l'augmentation de cette activité dans S1 sous-tend des anomalies comportementales (sociales et obsessionnelles), et des comportements normaux peuvent être restaurés en diminuant l'activité de S1 par des approches optogénétiques.

Toutefois, nos observations diffèrent de l'ensemble de ces données. Nous n'avons en effet pas relevé de modifications du nombre de cellules PV chez les souris adultes. En revanche, nos

données fonctionnelles mesurées à P60 révèlent une diminution de la connectivité inhibitrice, comme il l'a été rapporté dans un cas de MIA induite par une injection de Poly:(IC) à E9, sans modifications du nombre d'interneurones (Canetta *et al.* 2016). Cette baisse d'inhibition dans le cortex adulte pourrait résulter d'une compensation homéostatique excessive pour tenter d'ajuster l'inhibition exacerbée observée chez les jeunes souris de 3 semaines.

III. Conséquences divergentes d'une perturbation pré- ou post-natale des cellules microgliales au niveau des réseaux inhibiteurs

De façon remarquable, nos protocoles de déplétion microgliale embryonnaire et de MIA ont induits des effets anatomiques et fonctionnels très semblables. Bien qu'il ait été rapporté que les conséquences d'une activation microgliale peuvent être totalement à l'opposé de certaines modifications induites par la MIA (Cunningham *et al.* 2013 ; Squarzoni *et al.* 2014), l'ensemble de nos données indiquent clairement que la MIA détourne les cellules microgliales de leurs fonctions physiologiques, nécessaires au développement des réseaux d'interneurones néocorticaux.

En revanche, curieusement, nos données révèlent qu'une élimination microgliale prénatale induit des effets totalement opposés à la déplétion microgliale sur la transmission inhibitrice aux stades postnatals précoces et chez les adultes. Cela est étonnant car on pourrait penser qu'une perturbation de même nature induirait des effets similaires. Cependant, la temporalité de ces manipulations semble primordiale, et selon le stade auquel on active ou supprime la microglie, les conséquences physiologiques peuvent complètement diverger.

Globalement, la déplétion microgliale pendant le développement embryonnaire induit au long terme une diminution de l'inhibition soutenue par les interneurones inhibiteurs chez la descendance adulte. Cette perte d'inhibition est précédée d'une augmentation transitoire du nombre de cellules PV, et accompagnée d'une remarquable augmentation et de la connectivité fonctionnelle de ces interneurones inhibiteurs, coïncidant avec le stade de sevrage des jeunes souris.

Au contraire, l'élimination de la microglie pendant la première semaine de vie semble empêcher la maturation adéquate des connexions GABAergiques au moment de l'émergence de la circuiterie inhibitrice, mais plus tard, chez le jeune adulte, l'inhibition thalamocorticale est exacerbée, créant un déséquilibre de la balance E/I. Dans ces deux cas de perturbation pré-

et post-natale, des dysfonctionnements persistants de la connectivité inhibitrice ont donc été observés, même s'ils sont à l'opposé.

Nos données fonctionnelles préliminaires visant à élucider si les perturbations microgliales prénatales affectent la balance E/I à P20 ne sont pas pour l'instant conclusives (**Fig. III.5**). Dans le groupe MIA, il semble exister une tendance mais la différence avec le groupe contrôle n'est pas significative (**Fig. III.5.C**) ; et nous devons augmenter le nombre d'animaux examinés après déplétion microgliale, puisque les données obtenues ne proviennent que d'une seule portée.

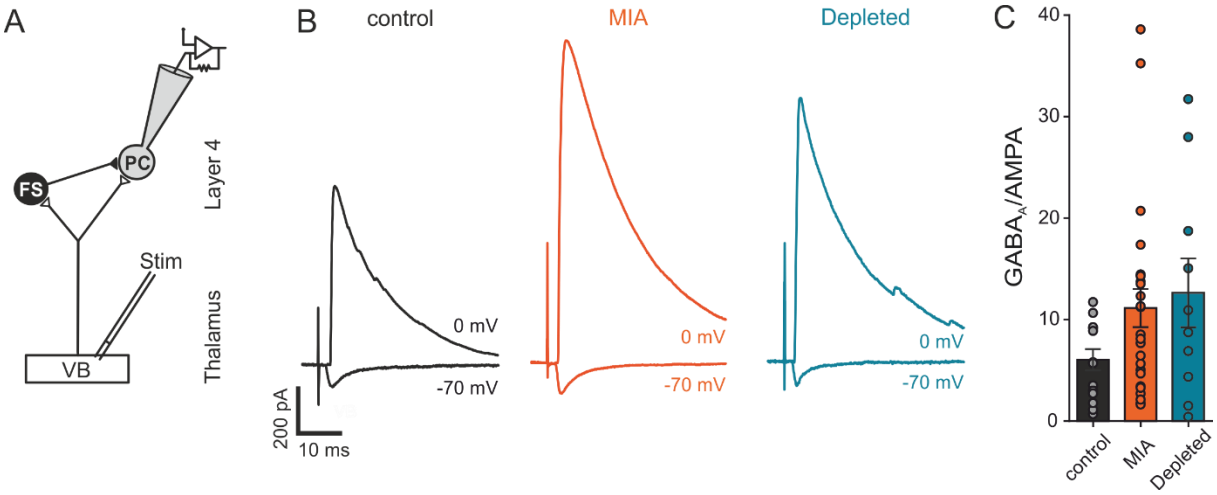


Figure III.5. Effets de la MIA et de la déplétion microgliale *in utero* sur l'inhibition *feedforward* disynaptique des cellules principales de la couche 4 à P20. A, Schéma de la configuration d'enregistrement des réponses monosynaptique excitatrice et disynaptique inhibitrice évoquées dans les PC de la L4 par stimulation du thalamus ventrobasal. **B**, Traces représentatives des EPSCs et IPSCs thalamocorticaux évoqués à -70 et 0 mV respectivement chez les souris contrôles, MIA et déplétées. **C**, Comparaison de la proportion d'inhibition feedforward calculée par le ratio des amplitudes $GABA_A$/AMPA chez les souris contrôles, MIA et déplétées (Tests Mann-Whitney U, contrôles vs MIA p = 0.074 ; contrôles vs déplétées p = 0.19 ou Kruskal Wallis : ns ; contrôles : N = 6, n = 14 ; MIA : N = 7, n = 25 ; déplétées : N = 4, n = 10).

De multiples raisons peuvent sous-tendre ces résultats contradictoires. La première est évidemment technique puisque nous n'avons pas utilisé les mêmes manipulations pour dépléter la microglie à ces deux stades. Il existe des données de transcriptomique pour les expériences menées avec les antagonistes du récepteur CSF-1 (voir ci-dessous) mais nous n'avons pas d'éléments de comparaison pour les déplétions effectuées avec le clodronate. Dans ce dernier cas, l'injection des liposomes étant effectuée dans le parenchyme cérébral, nous ne pouvons pas totalement exclure une réaction tissulaire de type inflammatoire qui pourrait avoir une influence sur les paramètres mesurés. Il faut noter toutefois que nous

n'avons pas observé de réactivité astrocytaire (marquage GFAP) et que la déplétion induite par le clodronate produit les mêmes effets que ceux observés chez les souris *CX3CR1*$^{Cre/+}$*::BDNF*$^{lox/lox}$, au moins chez les animaux juvéniles (P9-12). Cela n'est donc pas en faveur d'un effet du clodronate auquel s'ajouterait une réactivité du parenchyme liée l'injection.

Une seconde explication de ces effets divergents réside dans le fait que la déplétion après la naissance, au stade où des réseaux, comme ceux des SPNs transitoires, sont déjà en place, ne peut pas affecter la migration des interneurones. Au contraire, la déplétion *in utero* pourrait influencer la mise en place de ces réseaux transitoires essentiels au développement des réseaux inhibiteurs matures, notamment ceux impliqués dans l'inhibition *feedforward* (Kanold and Luhmann 2010 ; Marques-Smith *et al.* 2016). Il serait donc important de tester si, d'une part, la déplétion *in utero* affecte le développement des réseaux inhibiteurs transitoires et, d'autre part, si la déplétion postnatale perturbe la distribution laminaire et le nombre d'interneurones PV.

Par ailleurs, ces différences de résultats entre les protocoles de déplétion utilisés pourraient aussi simplement s'expliquer par le fait que la microglie entre E10.5 et E14.5 n'exprime pas les mêmes gènes qu'à P3-P5 (Matcovitch-Natan *et al.*, 2016) et ne régulent donc probablement pas les mêmes processus développementaux. Il serait donc logique dans cette optique que ces déplétions à divers stades développementaux induisent des perturbations différentes des processus neurodéveloppementaux.

Une autre possibilité pourrait être liée aux propriétés des microglies qui recolonisent le parenchyme cérébral après une déplétion. En effet, après leur élimination pendant le développement embryonnaire, les cellules microgliales recolonisent le SNC en 7 à 21 jours environ, selon les protocoles utilisés (Elmore *et al.* 2014 ; Huang *et al.* 2018). Si la microglie est supprimée à E6.5, les cellules microgliales sont donc présentes lors de la première semaine post-natale.

Effectivement, contrairement aux autres cellules du SNC, la microglie fait preuve d'une exceptionnelle capacité de régénération. Même en supprimant 99% des cellules microgliales avec l'anticorps anti-CSF1R, les cellules microgliales recolonisent le cerveau et la densité microgliale normale est restaurée au bout d'une semaine (Elmore *et al.* 2014). Récemment, l'utilisation de différentes souris transgéniques combinée à des approches de cartographie du lignage cellulaire a révélé que les cellules microgliales qui repeuplent le cerveau après une

déplétion aïgue – dans ce cas précis, induite par le PLX5622, un inhibiteur du CSF1R, pendant 14 jours dans l'alimentation chez des souris adultes – proviennent uniquement de la prolifération des cellules microgliales résiduelles (Huang *et al.* 2018). La « nouvelle microglie » présente un transcriptome différent de celui de la microglie résidente « historique », mais curieusement, cela n'influence pas les transcriptomes de l'ensemble du SNC, et donc l'homéostasie du cerveau. Les quelques gènes apparaissant comme différentiellement exprimés sont en effet des gènes microgliaux, comme Cx3cr1 ou Tmem119 (Huang *et al.* 2018).

On peut supposer que ces différences de propriétés transcriptomiques sous-tendent des fonctions microgliales différentes, et pourraient par exemple expliquer un déficit de libération de médiateur ou d'élagage synaptique. Cependant, Huang et ses collaborateurs ont testé la réponse des cellules microgliales générées après déplétion à une inflammation induite par le LPS, et ont montré que les profils transcriptomiques des « nouvelles » cellules microgliales ne différaient pas des « anciennes » résidentes, suggérant qu'elles partagent des fonctions similaires à celles de la microglie résidente dans les cerveaux sain et en contexte pathologique. Des preuves expérimentales indiquent qu'en plus de la transcription génique, des modifications épigénétiques peuvent déterminer le comportement microglial (Garden, 2013), elles pourraient donc également être impliquées dans les différences observées après différentes modalités de déplétion.

Il est donc certain que les cellules microgliales participent à la maturation des réseaux synaptiques inhibiteurs au cours du développement, mais leurs modes d'action ne sont toujours pas bien définis. De plus les mécanismes mis en jeu sont certainement différents en fonction de l'état de maturation du réseau ou de la structure étudiée.

En conclusion, la découverte de l'implication des cellules microgliales dans la régulation synaptique en conditions physiologiques a changé notre vision de l'importance de ces cellules dans la physiologie du SNC et a motivé un grand nombre d'études au cours de la dernière décennie. Compte tenu de la capacité de ces cellules immunitaires à réorienter leur phénotype en fonction des indices environnementaux, elles peuvent certainement être considérées comme le type de cellule le plus plastique du SNC.

Références

Agmon A, Connors BW (1991), Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortexin vitro. Neuroscience 41:365-379.

Allendoerfer KL, Shatz CJ (1994), The subplate, a transient neocortical structure: its role in the development of connections between thalamus and cortex. Annu Rev Neurosci 17:185–218.

Allène C, Cattani A, Ackman JB, Bonifazi P, Aniksztejn L, Ben-Ari Y, Cossart R (2008), Sequential Generation of Two Distinct Synapse-Driven Network Patterns in Developing Neocortex. Journal of Neuroscience 28:12851-12863.

Alliot F, Lecain E, Grima B, Pessac B (1991), Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain. . Proc Natl Acad Sci 88:1541–1545.

Amateau SK, McCarthy MM (2004), Induction of PGE2 by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior. . Nat Neurosci 7:643–650.

Antony JM, Paquin A, Nutt SL, Kaplan DR, Miller FD (2011), Endogenous microglia regulate development of embryonic cortical precursor cells. . J Neurosci Res 89:286–298.

Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SHR, Robitaille R, Volterra A (2014), Gliotransmitters Travel in Time and Space. Neuron 81:728-739.

Arnò B, Grassivaro F, Rossi C, Bergamaschi A, Castiglioni V, Furlan R, Greter M, Favaro R, et al. (2014), Neural progenitor cells orchestrate microglia migration and positioning into the developing cortex. Nature Communications 5.

Arnoux I, Audinat E (2015), Fractalkine Signaling and Microglia Functions in the Developing Brain. Neural Plasticity 2015:1-8.

Arnoux I, Hoshiko M, Mandavy L, Avignone E, Yamamoto N, Audinat E (2013), Adaptive phenotype of microglial cells during the normal postnatal development of the somatosensory “Barrel” cortex: Microglia phenotype during the normal development of CNS. Glia 61:1582-1594.

Arnoux I, Hoshiko M, Sanz Diez A, Audinat E (2014), Paradoxical effects of minocycline in the developing mouse somatosensory cortex. Glia 62:399-410.

Aronoff R, Petersen CC (2008), Layer, column and cell-type specific genetic manipulation in mouse barrel cortex. Front Neurosci 2:64-71.

Ashby MC, Isaac JTR (2011), Maturation of a Recurrent Excitatory Neocortical Circuit by Experience-Dependent Unsilencing of Newly Formed Dendritic Spines. Neuron 70:510-521.

Ashwell K (1989), Development of microglia in the albino rabbit retina. J Comp Neurol 287:286–301.

Ashwell K (1990), Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. Brain Res Dev Brain Res 55:219–230.

Askew K, Li K, Olmos-Alonso A, Garcia-Moreno F, Liang Y, Richardson P, Tipton T, Chapman MA, et al. (2017), Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. Cell Reports 18:391-405.

Avignone E, Ulmann L, Levavasseur F, Rassendren F, Audinat E (2008), Status epilepticus induces a particular microglial activation state characterized by enhanced purinergic signaling. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 28:9133-9144.

Babij R, De Marco Garcia N (2016), Neuronal activity controls the development of interneurons in the somatosensory cortex. Front Biol (Beijing) 11:459-470.

Balkowiec A, Katz DM (2000), Activity-Dependent Release of Endogenous Brain-Derived Neurotrophic Factor from Primary Sensory Neurons Detected by ELISAIn Situ. Journal of Neuroscience 20:7417-7423.

Bannister NJ (2005), Developmental Changes in AMPA and Kainate Receptor-Mediated Quantal Transmission at Thalamocortical Synapses in the Barrel Cortex. Journal of Neuroscience 25:5259-5271.

Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS, Malenka RC (2002), Control of synaptic strength by glial TNFalpha. . Science 295:2282–2285.

Bechade C, Cantaut-Belarif Y, Bessis A (2013), Microglial control of neuronal activity. . Front Cell Neurosci 7:32.

Benedetti B, Matyash V, Kettenmann H (2011), Astrocytes control GABAergic inhibition of neurons in the mouse barrel cortex: Astrocytes inhibit cortical neurons. The Journal of Physiology 589:1159-1172.

Bennett ML, Bennett FC, Liddelow SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, Mulinyawe SB, Bohlen CJ, et al. (2016), New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. Proceedings of the National Academy of Sciences 113:E1738-E1746.

Benshalom G, White EL (1986), Quantification of thalamocortical synapses with spiny stellate neurons in layer IV of mouse somatosensory cortex. The Journal of Comparative Neurology 253:303-314.

Berghuis P, Dobszay MB, Sousa KM, Schulte G, Mager PP, Härtig W, Görcs TJ, Zilberter Y, et al. (2004), Brain-derived neurotrophic factor controls functional differentiation and microcircuit formation of selectively isolated fast-spiking GABAergic interneurons. European Journal of Neuroscience 20:1290-1306.

Bergon A, Belzeaux, R., Comte, M., Pelletier, F., Hervé, M., Gardiner, E.J., Beveridge, N.J., Liu, B., Carr, V., Scott, R.J., Kelly, B., Cairns, M.J., Kumarasinghe, N., Schall, U., Blin, O., Boucraut, J., Tooney, P.A., Fakra, E., Ibrahim, E.C., (2015), CX3CR1 is dysregulated in blood and brain from schizophrenia patients. . Schizophr Res 168:434–443.

Bernardo KL, Woolsey TA (1987), Axonal trajectories between mouse somatosensory thalamus and cortex. J Comp Neurol 258:542-564.

Bertrand JY, Jalil A, Klaine M, Jung S, Cumano A, Godin I (2005), Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. Blood 106:3004– 3011.

Beumer W, Gibney SM, Drexhage RC, Pont-Lezica L, Doorduin J, Klein HC, Steiner J, Connor TJ, et al. (2012), The immune theory of psychiatric diseases: a key role for activated microglia and circulating monocytes. J Leukoc Biol 92:959-975.

Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E, Vescovi A, Bagetta G, et al. (2001), CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFα: amplification by microglia triggers neurotoxicity. Nature Neuroscience 4:702-710.

Bialas AR, Stevens B (2013), TGF-β Signaling Regulates Neuronal C1q Expression and Developmental Synaptic Refinement. Nature neuroscience 16:1773-1782.

Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HWGM (2007), Neuronal ‘On’ and ‘Off’ signals control microglia. Trends in Neurosciences 30:596-602.

Blinzinger K, Kreutzberg G (1968), Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria: 1948) 85:145-157.

Boche D, Perry VH, Nicoll JA (2013), Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. Neuropathol Appl Neurobiol 39:3-18.

Boksa P (2010), Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. . Brain Behav Immun.

Bonifazi P, Goldin M, Picardo MA, Jorquera I, Cattani A, Bianconi G, Represa A, Ben-Ari Y, et al. (2009), GABAergic hub neurons orchestrate synchrony in developing hippocampal networks. Science 326:1419-1424.

Borgdorff AJ, Poulet JF, Petersen CC (2007), Facilitating sensory responses in developing mouse somatosensory barrel cortex. J Neurophysiol 97:2992-3003.

Boucsein C, Kettenmann H, Nolte C (2000), Electrophysiological properties of microglial cells in normal and pathologic rat brain slices. Eur J Neurosci 12:2049–2058.

Brecht M, Sakmann B (2002), -Dynamic representation of whisker deflection by synaptic potentials in spiny stellate and pyramidal cells in the barrels and septa of layer 4 rat somatosensory cortex. The Journal of Physiology 543:49-70.

Brockhaus J, Ilschner S, Banati RB, Kettenmann H (1993), Membrane properties of ameboid microglial cells in the corpus callosum slice from early postnatal mice. . J Neurosci 13:4412–4421.

Brown GC, Neher JJ (2014), Microglial phagocytosis of live neurons. Nature Reviews Neuroscience 15:209-216.

Buiting AMJ, Rooijen NV (1994), Liposome Mediated Depletion of Macrophages: An Approach for Fundamental Studies. Journal of Drug Targeting 2:357-362.

Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, Koeglsperger T, Dake B, et al. (2014), Identification of a Unique TGF-β Dependent Molecular and Functional Signature in Microglia. Nature neuroscience 17:131-143.

Butt SJB, Stacey JA, Teramoto Y, Vagnoni C (2017), A role for GABAergic interneuron diversity in circuit development and plasticity of the neonatal cerebral cortex. Current Opinion in Neurobiology 43:149-155.

Cai Z, Pan ZL, Pang Y, Evans OB, Rhodes PG (2000), Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. . Pediatr Res 47:64–72.

Caldero J, Brunet N, Ciutat D, Hereu M, Esquerda JE (2009), Development of microglia in the chick embryo spinal cord: implications in the regulation of motoneuronal survival and death. J Neurosci Res 87:2447–2466.

Canetta S, Bolkan S, Padilla-Coreano N, Song LJ, Sahn R, Harrison NL, Gordon JA, Brown A, et al. (2016), Maternal immune activation leads to selective functional deficits in offspring parvalbumin interneurons. Molecular Psychiatry 21:956-968.

Cantaut-Belarif Y, Antri M, Pizzarelli R, Colasse S, Vaccari I, Soares S, Renner M, Dallel R, et al. (2017), Microglia control the glycinergic but not the GABAergic synapses via prostaglandin E2 in the spinal cord. The Journal of Cell Biology 216:2979-2989.

Cao M, Cortes M, Moore CS, Leong SY, Durosier LD, Burns P, Fecteau G, Desrochers A, et al. (2015), Fetal microglial phenotype in vitro carries memory of prior in vivo exposure to inflammation. . Front Cell Neurosci 9:294.

Cardona AE, Li M, Liu L, Savarin C, Ransohoff RM (2008), Chemokines in and out of the central nervous system: much more than chemotaxis and inflammation. Journal of Leukocyte Biology 84:587-594.

Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, et al. (2006), Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. Nat Neurosci 9:917-924.

Chamak B, Dobbertin A, Mallat M (1995), Immunohistochemical detection of thrombospondin in microglia in the developing rat brain. . Neuroscience 69:177– 187.

Chamak B, Morandi V, Mallat M (1994), Brain macrophages stimulate neurite growth and regeneration by secreting thrombospondin. . J Neurosci Res 38:221–233.

Chao MV (2003), Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. Nat Rev Neurosci 4:299-309.

Chattopadhyaya B, Cristo GD (2012), GABAergic Circuit Dysfunctions in Neurodevelopmental Disorders. Frontiers in Psychiatry 3.

Chen S-H, Oyarzabal EA, Hong J-S (2016), Critical role of the Mac1/NOX2 pathway in mediating reactive microgliosis-generated chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. Curr Opin Pharmacol 26:54–60.

Chen Z, Jalabi W, Hu W, Park H-J, Gale JT, Kidd GJ, Bernatowicz R, Gossman ZC, et al. (2014), Microglial displacement of inhibitory synapses provides neuroprotection in the adult brain. Nature Communications 5.

Cherubini E, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y (1991), GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. Trends Neurosci 14:515-519.

Chittajallu R, Isaac JTR (2010), Emergence of cortical inhibition by coordinated sensory-driven plasticity at distinct synaptic loci. Nature neuroscience 13:1240-1248.

Cho S-H, Sun B, Zhou Y, Kauppinen TM, Halabisky B, Wes P, Ransohoff RM, Gan L (2011), CX3CR1 Protein Signaling Modulates Microglial Activation and Protects against Plaque-independent Cognitive Deficits in a Mouse Model of Alzheimer Disease. Journal of Biological Chemistry 286:32713-32722.

Choi GB, Yim YS, Wong H, Kim S, Kim H, Kim SV, Hoeffer CA, Littman DR, et al. (2016), The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. Science 351:933-939.

Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CCA, Mullowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, et al. (2005), Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. . Cell 120:421– 433.

Chung S, Jeong J-H, Ko S, Yu X, Kim Y-H, Isaac JTR, Koretsky AP (2017), Peripheral Sensory Deprivation Restores Critical-Period-like Plasticity to Adult Somatosensory Thalamocortical Inputs. Cell Reports 19:2707-2717.

Chung W-S, Welsh CA, Barres BA, Stevens B (2015), Do glia drive synaptic and cognitive impairment in disease? Nature Neuroscience 18:1539-1545.

Clark AK, Gruber-Schoffnegger D, Drdla-Schutting R, Gerhold KJ, Malcangio M, Sandkuhler J (2015), Selective Activation of Microglia Facilitates Synaptic Strength. Journal of Neuroscience 35:4552-4570.

Clarke LE, Barres BA (2013), Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. Nat Rev Neurosci 14:311-321.

Colonna M, Butovsky O (2017), Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. Annu Rev Immunol 35:441-468.

Coull JAM, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, et al. (2005), BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. Nature 438:1017-1021.

Crair MC, Malenka RC (1995), A critical period for long-term potentiation at thalamocortical synapses. Nature 375:325-328.

Cronk JC, Derecki, N.C., Ji, E., Xu, Y., Lampano, A.E., Smirnov, I., Baker, W., Norris, G. T., Marin, I., Coddington, N., Wolf, Y., Turner, S.D., Aderem, A., Klibanov, A.L., Harris, T.H., Jung, S., Litvak, V., Kipnis, J., (2015), Methyl-CpG binding protein 2 regulates microglia and macrophage gene expression in response to inflammatory stimuli. . Immunity 42:679–691.

Cruikshank SJ, Lewis TJ, Connors BW (2007), Synaptic basis for intense thalamocortical activation of feedforward inhibitory cells in neocortex. Nature Neuroscience 10:462-468.

Cuadros MA, Navascués J (2001), Early origin and colonization of the developing central nervous system by microglial precursors. Progress in Brain Research 132:51-59.

Cuadros MA, Rodriguez-Ruiz J, Calvente R, Almendros A, Marin-Teva JL, Navascues J (1997), Microglia development in the quail cerebellum. . J Comp Neurol 389:390–401.

Cunningham CL, Martinez-Cerdeno V, Noctor SC (2013), Microglia Regulate the Number of Neural Precursor Cells in the Developing Cerebral Cortex. Journal of Neuroscience 33:4216-4233.

Curley AA, Arion D, Volk DW, Asafu-Adjei JK, Sampson AR, Fish KN, Lewis DA (2011), Cortical deficits of glutamic acid decarboxylase 67 expression in schizophrenia: clinical, protein, and cell type-specific features. Am J Psychiatry 168:921-929.

Dalmau I, Finsen B, Zimmer J, Gonzalez B, Castellano B (1998), Development of microglia in the postnatal rat hippocampus. . Hippocampus 8:458–474.

Dalmau I, Vela JM, Gonzalez B, Finsen B, Castellano B (2003), Dynamics of microglia in the developing rat brain. . J Comp Neurol 458:144–157.

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, et al. (2005), ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. Nature neuroscience 8:752-758.

Daw MI, Ashby MC, Isaac JTR (2007), Coordinated developmental recruitment of latent fast spiking interneurons in layer IV barrel cortex. Nature Neuroscience 10:453-461.

Daw MI, Scott HL, Isaac JTR (2007), Developmental synaptic plasticity at the thalamocortical input to barrel cortex: mechanisms and roles. Molecular and cellular neurosciences 34:493-502.

De Felipe J, Marco P, Fairén A, Jones EG (1997), Inhibitory synaptogenesis in mouse somatosensory cortex. Cerebral cortex (New York, NY: 1991) 7:619-634.

De Groot CJA, Huppes W, Sminia T, Kraal G, Dijkstra CD (1992), Determination of the origin and nature of brain macrophages and microglial cells in mouse central nervous system, using non-radioactive in situ hybridization and immunoperoxidase techniques. Glia 6:301-309.

DeFelipe J, López-Cruz PL, Benavides-Piccione R, Bielza C, Larrañaga P, Anderson S, Burkhalter A, Cauli B, et al. (2013), New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. Nature Reviews Neuroscience 14:202-216.

Derecki NC, Cronk, J.C., Lu, Z., Xu, E., Abbott, S.B.G., Guyenet, P.G., Kipnis, J. (2012), Wild-type microglia arrest pathology in a mouse model of Rett syndrome. . Nature 484:105–109.

Donato F, Chowdhury A, Lahr M, Caroni P (2015), Early- and late-born parvalbumin basket cell subpopulations exhibiting distinct regulation and roles in learning. Neuron 85:770-786.

Dufour A, Rollenhagen A, Sätzler K, Lübke JHR (2016), Development of Synaptic Boutons in Layer 4 of the Barrel Field of the Rat Somatosensory Cortex: A Quantitative Analysis. Cereb Cortex 26:838-854.

Dunning DD, Hoover CL, Soltesz I, Smith MA, O'Dowd DK (1999), GABA(A) receptor-mediated miniature postsynaptic currents and alpha-subunit expression in developing cortical neurons. Journal of neurophysiology 82:3286-3297.

E. Hirbec H, Noristani HN, Perrin FE (2017), Microglia Responses in Acute and Chronic Neurological Diseases: What Microglia-Specific Transcriptomic Studies Taught (and did Not Teach) Us. Frontiers in Aging Neuroscience 9.

Earle KL, Mitrofanis, J. (1998), Development of glia and blood vessels in the internal capsule of rats. . J Neurocytol 27:127–139.

Ekdahl CT (2012), Microglial activation — tuning and pruning adult neurogenesis. . Front Pharmacol 3:41.

Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, et al. (2009), Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. . Nature 461:282–286.

Ellman LM, Deicken RF, Vinogradov S, Kremen WS, Poole JH, Kern DM, Tsai WY, Schaefer CA, et al. (2010), Structural brain alterations in schizophrenia following fetal exposure to the inflammatory cytokine interleukin-8. . Schizophr Res 121:46–54.

Elmore Monica RP, Najafi Allison R, Koike Maya A, Dagher Nabil N, Spangenberg Elizabeth E, Rice Rachel A, Kitazawa M, Matusow B, et al. (2014), Colony-Stimulating Factor 1 Receptor Signaling Is Necessary for Microglia Viability, Unmasking a Microglia Progenitor Cell in the Adult Brain. Neuron 82:380-397.

Erblich B, Zhu L, Etgen AM, Dobrenis K, Pollard JW (2011), Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. PLoS One 6:e26317.

Erzurumlu RS, Gaspar P (2012), Development and critical period plasticity of the barrel cortex. The European journal of neuroscience 35:1540-1553.

Eyo UB, Miner SA, Weiner JA, Dailey ME (2015), Developmental changes in microglial mobilization are independent of apoptosis in the neonatal mouse hippocampus. . Brain Behav Immun 55:49–59.

Eyo UB, Wu LJ (2013), Bidirectional microglia-neuron communication in the healthy brain. Neural Plasticity.

Fagiolini M, Hensch TK (2000), Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. Nature 404:183-186.

Fatemi SH, Halt AR, Stary JM, Kanodia R, Schulz SC, Realmuto GR (2002), Glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa proteins are reduced in autistic parietal and cerebellar cortices. Biological Psychiatry 52:805-810.

Fedoroff S, Zhai R, Novak JP (1997), Microglia and astroglia have a common progenitor cell. J Neurosci 50:477-486.

Feldman DE, Nicoll RA, Malenka RC, Isaac JT (1998), Long-term depression at thalamocortical synapses in developing rat somatosensory cortex. Neuron 21:347-357.

Feldmeyer D (2012), Excitatory neuronal connectivity in the barrel cortex. Frontiers in Neuroanatomy 6:24.

Feldmeyer D, Brecht M, Helmchen F, Petersen CCH, Poulet JFA, Staiger JF, Luhmann HJ, Schwarz C (2013), Barrel cortex function. Progress in Neurobiology 103:3-27.

Filipello F, Morini R, Corradini I, Zerbi V, Canzi A, Michalski B, Erreni M, Markicevic M, et al. (2018), The Microglial Innate Immune Receptor TREM2 Is Required for Synapse Elimination and Normal Brain Connectivity. Immunity 48:979-991.e978.

Fishell G, Rudy B (201), Mechanisms of inhibition within the telencephalon: "where the wild things are". Annu Rev Neurosci 34:535-567.

Foeller E, Feldman DE (2004), Synaptic basis for developmental plasticity in somatosensory cortex. Curr Opin Neurobiol 14:89-95.

Fourgeaud L, Través PG, Tufail Y, Leal-Bailey H, Lew ED, Burrola PG, Callaway P, Zagórska A, et al. (2016), TAM receptors regulate multiple features of microglial physiology. Nature 532:240-244.

Frade JM, Barde YA (1998), Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. . Neuron 20:35–41.

Frick LR, Williams K, Pittenger C (2013), Microglial dysregulation in psychiatric disease. . Clin Dev Immunol

Fritschy JM, Mohler H (1995), GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. J Comp Neurol 359:154-194.

Gabernet L, Jadhav SP, Feldman DE, Carandini M, Scanziani M (2005), Somatosensory Integration Controlled by Dynamic Thalamocortical Feed-Forward Inhibition. Neuron 48:315-327.

Garden GA (2013), Epigenetics and the modulation of neuroinflammation. Neurotherapeutics 10:782-788.

Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, et al. (2010), Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. Science (New York, NY) 330:841-845.

Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T (2013), Origin and differentiation of microglia. Frontiers in cellular neuroscience 7:45.

Ginhoux F, Schultze JL, Murray PJ, Ochando J, Biswas SK (2016), New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. Nat Immunol 17:34-40.

Giovanoli S, Engler H, Engler A, Richetto J, Voget M, Willi R, Winter C, Riva MA, et al. (2013), Stress in puberty unmasks latent neuropathological consequences of prenatal immune activation in mice. . Science 339:1095–1099.

Giovanoli S, Weber-Stadlbauer U, Schedlowski M, Meyer U, Engler H (2016), Prenatal immune activation causes hippocampal synaptic deficits in the absence of overt microglia anomalies. Brain Behav Immun 55:25-38.

Gogolla N, Leblanc JJ, Quast KB, Südhof TC, Fagiolini M, Hensch TK (2009), Common circuit defect of excitatory-inhibitory balance in mouse models of autism. Journal of Neurodevelopmental Disorders 1:172-181.

Goldmann T, Wieghofer P, Jordao MJ, Prutek F, Hagemeyer N, Frenzel K, Amann L, Staszewski O, et al. (2016), Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. Nat Immunol 17:797-805.

Grabert K, Michoel T, Karavolos MH, Clohisey S, Baillie JK, Stevens MP, Freeman TC, Summers KM, et al. (2016), Microglial brain region- dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. . Nat Neurosci 19:504–516.

Greter M, Lelios I, Pelczar P, Hoeffel G, Price J, Leboeuf M, Kundig TM, Frei K, et al. (2012), Stroma-derived interleukin-34 controls the development and maintenance of langerhans cells and the maintenance of microglia. . Immunity 37:1050–1060.

Gude DR, Alvarez SE, Paugh SW, Mitra P, Yu J, Griffiths R, Barbour SE, Milstien S, et al. (2008), Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a come-and-get-me signal. FASEB J 22:2629–2638.

Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogaeva E, Majounie E, Cruchaga C, Sassi C, et al. (2013), TREM2 variants in Alzheimer's disease. N Engl J Med 368:117-127.

Haimon Z, Volaski A, Orthgiess J, Boura-Halfon S, Varol D, Shemer A, Yona S, Zuckerman B, et al. (2018), Re-evaluating microglia expression profiles using RiboTag and cell isolation strategies. Nature Immunology 19:636-644.

Hanamsagar R, Bilbo SD (2016), Sex differences in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders: focus on microglial function and neuroinflammation during development. . J Steroid Biochem Mol Biol

Hanamsagar R, Bilbo SD (2017), Environment matters: microglia function and dysfunction in a changing world. Current Opinion in Neurobiology 47:146-155.

Hanisch U-K, Kettenmann H (2007), Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nature neuroscience 10:1387-1394.

Harlow EG, Till SM, Russell TA, Wijetunge LS, Kind P, Contractor A (2010), Critical period plasticity is disrupted in the barrel cortex of Fmr1 knockout mice. Neuron 65:385-398.

Harris KD, Shepherd GMG (2015), The neocortical circuit: themes and variations. Nature neuroscience 18:170-181.

Hart AD, Wyttenbach A, Hugh Perry V, Teeling JL (2012), Age related changes in microglial phenotype vary between CNS regions: grey versus white matter differences. . Brain Behav Immun 26:754–765.

Hashimoto T, Volk DW, Eggan SM, Mirnics K, Pierri JN, Sun Z, R. SA, Lewis DA (2003), Gene Expression Deficits in a Subclass of GABA Neurons in the Prefrontal Cortex of Subjects with Schizophrenia. J Neurosci 23:6315-6326.

Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan WB, Julius D (2006), The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. Nat Neurosci 9:1512-1519.

Hensch TK (2005), Critical period plasticity in local cortical circuits. Nat Rev Neurosci 6:877-888.

Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B (2015), Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. Nat Rev Neurosci 16:358-372.

Herbomel P, Thisse B, 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.

Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi T, Borowsky M, Wang L-c, Means TK, Khoury JE (2013), The Microglial Sensome Revealed by Direct RNA Sequencing. Nature neuroscience 16:1896-1905.

Hildebrand ME, Xu J, Dedek A, Li Y, Sengar AS, Beggs S, Lombroso PJ, Salter MW (2016), Potentiation of Synaptic GluN2B NMDAR Currents by Fyn Kinase Is Gated through BDNF-Mediated Disinhibition in Spinal Pain Processing. Cell Reports 17:2753-2765.

Hippenmeyer S, Vrieseling E, Sigrist M, Portmann T, Laengle C, Ladle DR, Arber S (2005), A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. PLoS Biol 3:e159.

Hirsch E, Irikura VM, Paul SM, Hirsh D (1996), Functions of interleukin 1 receptor antagonist in gene knockout and overproducing mice. . Proc Natl Acad Sci 93:11008–11013.

Hoeffel G, Ginhoux F (2015), Ontogeny of tissue-resident macrophages. Front Immunol 6: 486.

Hoeppner DJ, Hengartner MO, Schnabel R (2001), Engulfment genes cooperate with ced-3 to promote cell death in Caenorhabditis elegans. . Nature 412:202– 206.

Horiuchi M, Smith, L., Maezawa, I., Jin, L.-W., (2016), CX3CR1 ablation ameliorates motor and respiratory dysfunctions and improves survival of a Rett syndrome mouse model. . Brain Behav Immun 60:106–116

Hoshiko M, Arnoux I, Avignone E, Yamamoto N, Audinat E (2012), Deficiency of the microglial receptor CX3CR1 impairs postnatal functional development of thalamocortical synapses in the barrel cortex. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 32:15106-15111.

Houades V, Koulakoff A, Ezan P, Seif I, Giaume C (2008), Gap Junction-Mediated Astrocytic Networks in the Mouse Barrel Cortex. Journal of Neuroscience 28:5207-5217.

Hsueh PT, Lin HH, Wang HH, Liu CL, Ni WF, Liu JK, Chang HH, Sun DS, et al. (2018), Immune imbalance of global gene expression, and cytokine, chemokine and selectin levels in the brains of offspring with social deficits via maternal immune activation. Genes Brain Behav e12479.

Hua JY, Smith SJ (2004), Neural activity and the dynamics of central nervous system development. . Nat Neurosci 7:327–332.

Huang Y, Xu Z, Xiong S, Sun F, Qin G, Hu G, Wang J, Zhao L, et al. (2018), Repopulated microglia are solely derived from the proliferation of residual microglia after acute depletion. Nature Neuroscience 21:530-540.

Huang ZJ, Kirkwood A, Pizzorusso T, Porciatti V, Morales B, Bear MF, Maffei L, Tonegawa S (1999), BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. Cell 98:739-755.

Hubel DH, Wiesel TN (1964), Effects of monocular deprivation in kittens. Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmakol 248:492-497.

Hull C, Isaacson JS, Scanziani M (2009), Postsynaptic mechanisms govern the differential excitation of cortical neurons by thalamic inputs. The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience 29:9127-9136.

Hume DA, Perry VH, Gordon S (1983), Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. J Cell Biol 97:253–257.

Imamoto K, Leblond CP (1978), Radioautographic investigation of gliogenesis in the corpus callosum of young rats. II. Origin of microglial cells. . J Comp Neurol 180:139–163.

Inan M, Crair MC (2007), Development of Cortical Maps: Perspectives From the Barrel Cortex. The Neuroscientist 13:49-61.

Inan M, Lu HC, Albright MJ, She WC, Crair MC (2006), Barrel map development relies on protein kinase A regulatory subunit II beta-mediated cAMP signaling. J Neurosci 26:4338-4349.

Inoue T, Imoto K (2006), Feedforward inhibitory connections from multiple thalamic cells to multiple regular-spiking cells in layer 4 of the somatosensory cortex. J Neurophysiol 96:1746-1754.

Isaac JTR, Crair MC, Nicoll RA, Malenka RC (1997), Silent Synapses during Development of Thalamocortical Inputs. Neuron 18:269-280.

Itami C, Kimura F, Kohno T, Matsuoka M, Ichikawa M, Tsumoto T, Nakamura S (2003), Brain-derived neurotrophic factor-dependent unmasking of "silent" synapses in the developing mouse barrel cortex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100:13069-13074.

Itami C, Kimura F, Nakamura S (2007), Brain-Derived Neurotrophic Factor Regulates the Maturation of Layer 4 Fast-Spiking Cells after the Second Postnatal Week in the Developing Barrel Cortex. Journal of Neuroscience 27:2241-2252.

Jacob V, Estebanez L, Le Cam J, Tiercelin JY, Parra P, Paresys G, Shulz DE (2010), The Matrix: a new tool for probing the whisker-to-barrel system with natural stimuli. J Neurosci Methods 189:65-74.

Jiao Y, Zhang Z, Zhang C, Wang X, Sakata K, Lu B, Sun Q-Q (2011), A key mechanism underlying sensory experience-dependent maturation of neocortical GABAergic circuits in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences 108:12131-12136.

Juckel G, Manitz, M.P., Brüne, M., Friebe, A., Heneka, M.T., Wolf, R.J. (2011), Microglial activation in a neuroinflammational animal model of schizophrenia — a pilot study. . Schizophr Res 131:96–100.

Kang SS, Baker KE, Wang X, Kocher J-P, Fryer JD (2017), Translational Profiling Of Microglia Reveals Artifacts Of Cell Sorting.

Kanold PO, Luhmann HJ (2010), The Subplate and Early Cortical Circuits. Annual Review of Neuroscience 33:23-48.

Kaur C, Ling E, Wong W (1987), Origin and fate of neural macrophages in a stab wound of the brain of the young rat. J Anat 154:215-227.

Kawasaki Y, Zhang L, Cheng J-K, Ji R-R (2008), Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. . J Neurosci 28:5189–5194.

Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011), Physiology of microglia. Physiol Rev 91:461-553.

Khazipov R, Luhmann HJ (2006), Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. Trends Neurosci 29:414-418.

Kidd FL, Isaac JTR (1999), Developmental and activity- dependent regulation of kainate receptors at thalamocortical synapses. Nature 400:569-573.

Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, Wieghofer P, Heinrich A, et al. (2013), Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. Nat Neurosci 16:273–280.

Kierdorf K, Prinz M (2013), Factors regulating microglia activation. Front Cell Neurosci 7:44.

Kim H-J, Cho M-H, Shim WH, Kim JK, Jeon E-Y, Kim D-H, Yoon S-Y (2017), Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects. Molecular Psychiatry 22:1576-1584.

Kim S, Kim H, Yim YS, Ha S, Atarashi K, Tan TG, Longman RS, Honda K, et al. (2017), Maternal gut bacteria promote neurodevelopmental abnormalities in mouse offspring. Nature 549:528-532.

Kitayama M, Ueno M, Itakura T, Yamashita T (2011), Activated Microglia Inhibit Axonal Growth through RGMa. PLoS ONE 6:e25234.

Knuesel I, Chicha L, Britschgi M, Schobel SA, Bodmer M, Hellings JA, Toovey S, Prinssen EP (2014), Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. Nature Reviews Neurology 10:643-660.

Koelbl C, Helmstaedter M, Lübke J, Feldmeyer D (2015), A Barrel-Related Interneuron in Layer 4 of Rat Somatosensory Cortex with a High Intrabarrel Connectivity. Cerebral Cortex 25:713-725.

Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, Joshi BV, Jacobson KA, et al. (2007), UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. . Nature 446:1091–1095.

Kolodziejczak M, Béchade C, Gervasi N, Irinopoulou T, Banas SM, Cordier C, Rebsam A, Roumier A, et al. (2015), Serotonin Modulates Developmental Microglia via 5-HT $_{2B}$ Receptors: Potential Implication during Synaptic Refinement of Retinogeniculate Projections. ACS Chemical Neuroscience 6:1219-1230.

Kroon T, Sierksma MC, Meredith RM (2013), Investigating mechanisms underlying neurodevelopmental phenotypes of autistic and intellectual disability disorders: a perspective. Frontiers in Systems Neuroscience 7.

Krstic D, Madhusudan, A., Doehner, J., Vogel, P., Notter, T., Imhof, C., Manalastas, A., Hilfiker, M., Pfister, S., Schwerdel, C., Riether, C., Meyer, U., Knuesel, I., (2012), Systemic immune challenges trigger and drive Alzheimer-like neuropathology in mice. . J Neuroinflamm 9:151.

Lai AY, Todd KG (2006), Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions. . Can J Physiol Pharmacol 84:49–59.

Lauber K, Bohn E, Kröber SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, et al. (2003), Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. . Cell 113:717–730.

Le Magueresse C, Monyer H (2013), GABAergic Interneurons Shape the Functional Maturation of the Cortex. Neuron 77:388-405.

Lee H, Brott BK, Kirkby LA, Adelson JD, Cheng S, Feller MB, Datwani A, Shatz CJ (2014), Synapse elimination and learning rules co-regulated by MHC class I H2-Db. Nature 509:195-200.

Lee S, Hjerling-Leffler J, Zagha E, Fishell G, Rudy B (2010), The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors. J Neurosci 30:16796-16808.

Lefort S, Tomm C, Floyd Sarria JC, Petersen CC (2009), The excitatory neuronal network of the C2 barrel column in mouse primary somatosensory cortex. Neuron 61:301-316.

Lelli A, Gervais A, Colin C, Cheret C, Ruiz de AC, Carmeliet P, Krause KH, Boillee S, et al. (2013), The NADPH oxidase Nox2 regulates VEGFR1/CSF-1R- mediated microglial chemotaxis and promotes early postnatal infiltration of phagocytes in the subventricular zone of the mouse cerebral cortex. Glia 61:1542–1555.

Lenz KM, Nugent BM, Haliyur R, McCarthy MM (2013), Microglia Are Essential to Masculinization of Brain and Behavior. Journal of Neuroscience 33:2761-2772.

Lenz KM, Wright CL, Martin RC, McCarthy MM (2011), Prostaglandin E2 regulates AMPA receptor phosphorylation and promotes membrane insertion in preoptic area neurons and glia during sexual differentiation. . PLoS One 6:e18500.

Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW (2005), Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. Nature Reviews Neuroscience 6:312-324.

Lewitus GM, Konefal SC, Greenhalgh AD, Pribiag H, Augereau K, Stellwagen D (2016), Microglial TNF-α Suppresses Cocaine-Induced Plasticity and Behavioral Sensitization. Neuron 0.

Li H, Crair MC (2011), How do barrels form in somatosensory cortex? Ann N Y Acad Sci 1225:119-129.

Li P, Huntsman MM (2014), Two functional inhibitory circuits are comprised of a heterogeneous population of fast-spiking cortical interneurons. Neuroscience 265:60-71.

Li Y, Du X-F, Liu C-S, Wen Z-L, Du J-L (2012), Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. Developmental cell 23:1189-1202.

Liang KJ, Lee JE, Wang YD, Ma W, Fontainhas AM, Fariss RN, Wong WT (2009), Regulation of Dynamic Behavior of Retinal Microglia by CX3CR1 Signaling. Investigative Opthalmology & Visual Science 50:4444.

Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Munch AE, et al. (2017), Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. Nature 541:481-487.

Lim SH, Park E, You B, Jung Y, Park AR, Park SG, Lee JR (2013), Neuronal synapse formation induced by microglia and interleukin 10. PLoS One 8:e81218.

Ling E (1994), Monocytic origin of ramified microglia in the corpus callosum in postnatal rat. Neuropathol Appl Neurobiol 20:182–183.

López-Bendito G, Cautinat A, Sánchez JA, Bielle F, Flames N, Garratt AN, Talmage DA, Role LW, et al. (2006), Tangential Neuronal Migration Controls Axon Guidance: A Role for Neuregulin-1 in Thalamocortical Axon Navigation. Cell 125:127-142.

Lu H-C, Gonzalez E, Crair MC (2001), Barrel Cortex Critical Period Plasticity Is Independent of Changes in NMDA Receptor Subunit Composition. Neuron 32:619-634.

Lu HC, Butts DA, Kaeser PS, She WC, Janz R, Crair MC (2006), Role of efficient neurotransmitter release in barrel map development. J Neurosci 26:2692-2703.

Lu W, Gray JA, Granger AJ, During MJ, Nicoll RA (2011), Potentiation of synaptic AMPA receptors induced by the deletion of NMDA receptors requires the GluA2 subunit. J Neurophysiol 105:923-928.

Lübke J, Egger V, Sakmann B, Feldmeyer D (2000), Columnar organization of dendrites and axons of single and synaptically coupled excitatory spiny neurons in layer 4 of the rat barrel cortex. J Neurosci 20:5300-5311.

Maggi L, Scianni M, Branchi I, D'Andrea I, Lauro C, Limatola C (2011), CX(3)CR1 deficiency alters hippocampal-dependent plasticity phenomena blunting the effects of enriched environment. Frontiers in Cellular Neuroscience 5:22.

Marín O, Rubenstein JL (2001), A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. Nature Reviews Neuroscience 2:780-790.

Marín-Teva JL, Almendros A, Calvente R, Cuadros MA, Navascues J (1998), Tangential migration of ameboid microglia in the developing quail retina: mechanism of migration and migratory behavior. Glia 22:31-52.

Marín-Teva JL, Almendros A, Calvente R, Cuadros MA, Navascues J (1999), Proliferation of actively migrating ameboid microglia in the developing quail retina. . Anat Embryol 200:289–300.

Marín-Teva JL, Cuadros MA, Calvente R, Almendros A, Navascues 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 JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M (2004), Microglia Promote the Death of Developing Purkinje Cells. Neuron 41:535-547.

Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004), Interneurons of the neocortical inhibitory system. Nat Rev Neurosci 5:793-807.

Marques-Smith A, Lyngholm D, Kaufmann A-K, Stacey JA, Hoerder-Suabedissen A, Becker EBE, Wilson MC, Molnár Z, et al. (2016), A Transient Translaminar GABAergic Interneuron Circuit Connects Thalamocortical Recipient Layers in Neonatal Somatosensory Cortex. Neuron 89:536-549.

Martinez FO, Gordon S (2014), The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. F1000Prime Rep 6:13.

Marty A, Llano I (2005), Excitatory effects of GABA in established brain networks. Trends in Neurosciences 28:284-289.

Marty S, da M, Berninger B (1997), Neurotrophins and activity-dependent plasticity of cortical interneurons. Trends in Neurosciences 20:198-202.

Matcovitch-Natan O, Winter DR, Giladi A, Aguilar SV, Spinrad A, Sarrazin S, Ben-Yehuda H, David E, et al. (2016), Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. Science 353:aad8670.

Mattei D, Ivanov A, Ferrai C, Jordan P, Guneykaya D, Buonfiglioli A, Schaafsma W, Przanowski P, et al. (2017), Maternal immune activation results in complex microglial transcriptome signature in the adult offspring that is reversed by minocycline treatment. Transl Psychiatry 7:e1120.

McCarthy MM, Pickett LA, VanRyzin JW, Kight KE (2015), Surprising origins of sex differences in the brain. Hormones and Behavior 76:3-10.

Menteyne A, Levavasseur F, Audinat E, Avignone E (2009), Predominant functional expression of Kv1.3 by activated microglia of the hippocampus after Status epilepticus. PloS one 4:e6770.

Meyer HS, Schwarz D, Wimmer VC, Schmitt AC, Kerr JN, Sakmann B, Helmstaedter M (2011), Inhibitory interneurons in a cortical column form hot zones of inhibition in layers 2 and 5A. Proc Natl Acad Sci 108:16807-16812.

Meyer U (2014), Prenatal Poly(I:C) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems. . Biol Psychiatry

Meyer U, Feldon J, Fatemi SH (2009), In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. . Neurosci Biobehav Rev

Meyer U, Feldon J, Yee BK (2009), A review of the fetal brain cytokine imbalance hypothesis of schizophrenia. . Schizophr Bull.

Meyer U, Murray PJ, Urwyler A, Yee BK, Schedlowski M, Feldon J (2008), Adult behavioral and pharmacological dysfunctions following disruption of the fetal brain balance between pro-inflammatory and IL-10-mediated anti- inflammatory signaling. . Mol Psychiatry 13:208–221.

Minten C, Terry R, Deffrasnes C, King NJC, Campbell IL (2012), IFN regulatory factor 8 is a key constitutive determinant of the morphological and molecular properties of microglia in the CNS. PLoS One 7 e49851.

Miyamoto A, Wake H, Ishikawa AW, Eto K, Shibata K, Murakoshi H, Koizumi S, Moorhouse AJ, et al. (2016), Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. Nature Communications 7:12540.

Möller T, Bard F, Bhattacharya A, Biber K, Campbell B, Dale E, Eder C, Gan L, et al. (2016), Critical data-based re-evaluation of minocycline as a putative specific microglia inhibitor. Glia 64:1788-1794.

Monier A, dle-Biassette H, Delezoide AL, Evrard P, Gressens P, Verney C (2007), Entry and distribution of microglial cells in human embryonic and fetal cerebral cortex. . J Neuropathol Exp Neurol 66:372–382.

Monier A, Evrard, P., Gressens, P., Verney, C. (2006), Distribution and differentiation of microglia in the human encephalon during the first two trimesters of gestation. J Comp Neurol 499:565–582.

Montgomery JM, Pavlidis P, Madison DV (2001), Pair Recordings Reveal All-Silent Synaptic Connections and the Postsynaptic Expression of Long-Term Potentiation. Neuron 29:691-701.

Morgan SC, Taylor DL, Pocock JM (2004), Microglia release activators of neuronal proliferation mediated by activation of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and delta-Notch signalling cascades. . JNeurochem 90:89–101.

Morganti JM, Nash KR, Grimmig BA, Ranjit S, Small B, Bickford PC, Gemma C (2012), The soluble isoform of CX3CL1 is necessary for neuroprotection in a mouse model of Parkinson's disease. J Neurosci 32:14592-14601.

Mosser C-A, Baptista S, Arnoux I, Audinat E (2017), Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future. Progress in Neurobiology 149-150:1-20.

Moujahid A, Navascués J, Marín-Teva JL, Cuadros MA (1996), Macrophages during avian optic nerve development: relationship to cell death and differentiation into microglia. Anat Embryol 193:131–144.

Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, Gordon S, Hamilton JA, et al. (2014), Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. Immunity 41:14-20.

Nagata K, Nakajima K, Kohsaka S (1993), Plasminogen promotes the development of rat mesencephalic dopaminergic neurons in vitro. . Brain Res Dev Brain Res 75:31–37.

Navascues J, Calvente R, Marin-Teva JL, Cuadros MA (2000), Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system. . An Acad Bras Cienc 72:91–102.

Nelson LH, Lenz KM (2017), Microglia depletion in early life programs persistent changes in social, mood-related, and locomotor behavior in male and female rats. Behavioural Brain Research 316:279-293.

Nelson SB, Valakh V (2015), Excitatory/Inhibitory Balance and Circuit Homeostasis in Autism Spectrum Disorders. Neuron 87:684-698.

Nikodemova M, Kimyon RS, De I, Small AL, Collier LS, Watters JJ (2015), Microglial numbers attain adult levels after undergoing a rapid decrease in cell number in the third postnatal week. Journal of Neuroimmunology 278:280-288.

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005), Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science (New York, NY) 308:1314-1318.

O'Loughlin E, Pakan JMP, Yilmazer-Hanke D, McDermott KW (2017), Acute in utero exposure to lipopolysaccharide induces inflammation in the pre- and postnatal brain and alters the glial cytoarchitecture in the developing amygdala. Journal of Neuroinflammation 14:212.

Ohsawa K, Irino Y, Nakamura Y, Akazawa C, Inoue K, Kohsaka S (2007), Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. Glia 55:604-616.

Olsen RW, Sieghart W (2009), GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. Neuropharmacology 56:141-148.

Oppenheim RW (1991), Cell death during development of the nervous system. Annu Rev Neurosci 14:453–501.

Orr AG, Orr AL, Li XJ, Gross RE, Traynelis SF (2009), Adenosine A(2A) receptor mediates microglial process retraction. Nat Neurosci 12:872-878.

Pagani F, Paolicelli RC, Murana E, Cortese B, Di Angelantonio S, Zurolo E, Guiducci E, Ferreira TA, et al. (2015), Defective microglial development in the hippocampus of Cx3cr1 deficient mice. . Front Cell Neurosci 9:111.

Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G (1999), Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. Development 126:5073–5084.

Paloneva J, Kestilä, M., Wu, J., Salminen, A., Böhling, T., Ruotsalainen, V., Hakola, P., Bakker, A.B., Phillips, J.H., Pekkarinen, P., Lanier, L.L., Timonen, T., Peltonen, L., (2000), Loss-of-function mutations in TYROBP (DAP12) result in a presenile dementia with bone cysts. . Nat Genet 25:357–361.

Paolicelli RC, Bisht K, Tremblay ME (2014), Fractalkine regulation of microglial physiology and consequences on the brain and behavior. Front Cell Neurosci 8:129.

Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, et al. (2011), Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. Science (New York, NY) 333:1456-1458.

Parkhurst Christopher N, Yang G, Ninan I, Savas Jeffrey N, Yates John R, Lafaille Juan J, Hempstead Barbara L, Littman Dan R, et al. (2013), Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. Cell 155:1596-1609.

Pascual O, Achour SB, Rostaing P, Triller A, Bessis A (2012), Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. Proceedings of the National Academy of Sciences 109:E197-E205.

Patterson PH (2011), Maternal infection and immune involvement in autism. Trends Mol Med 17:389-394.

Perry VH, Hume DA, Gordon S (1985), Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. Neuroscience 15:313–326.

Petersen CCH (2007), The Functional Organization of the Barrel Cortex. Neuron 56:339-355.

Pfeiffer T, Avignone E, Nagerl UV (2016), Induction of hippocampal long-term potentiation increases the morphological dynamics of microglial processes and prolongs their contacts with dendritic spines. Sci Rep 6:32422.

Pollard JW (2009), Trophic macrophages in development and disease. . Nat Rev Immunol 9:259–270.

Pont-Lezica L, Béchade C, Belarif-Cantaut Y, Pascual O, Bessis A (2011), Physiological roles of microglia during development. Journal of Neurochemistry 119:901–908.

Pont-Lezica L, Beumer W, Colasse S, Drexhage H, Versnel M, Bessis A (2014), Microglia shape corpus callosum axon tract fasciculation: functional impact of prenatal inflammation. European Journal of Neuroscience 39:1551-1557.

Poon VY, Choi S, Park M (2013), Growth factors in synaptic function. Front Synaptic Neurosci

Porter JT, Johnson CK, Agmon A (2001), Diverse Types of Interneurons Generate Thalamus-Evoked Feedforward Inhibition in the Mouse Barrel Cortex. The Journal of Neuroscience 21:2699-2710.

Prinz M, Priller J (2014), Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. Nat Rev Neurosci 15:300-312.

Rachal Pugh C, Fleshner M, Watkins LR, Maier SF, Rudy JW (2001), The immune system and memory consolidation: a role for the cytokine IL-1beta. . Neurosci Biobehav Rev 25:29–41.

Rakic S, Zecevic N (2000), Programmed cell death in the developing human telencephalon. Eur J Neurosci 12:2721–2734.

Ransohoff RM (2016), A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? Nat Neurosci 19:987-991.

Ransohoff RM, Perry VH (2009), Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. Annual review of immunology 27:119-145.

Rauskolb S, Zagrebelsky M, Dreznjak A, Deogracias R, Matsumoto T, Wiese S, Erne B, Sendtner M, et al. (2010), Global deprivation of brain-derived neurotrophic factor in the CNS reveals an area-specific requirement for dendritic growth. The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience 30:1739-1749.

Rebsam A, Seif I, Gaspar P (2002), Refinement of thalamocortical arbors and emergence of barrel domains in the primary somatosensory cortex: a study of normal and monoamine oxidase a knock-out mice. J Neurosci 22:8541-8552.

Reddien PW, Cameron S, Horvitz HR (2001), Phagocytosis promotes programmed cell death in C. elegans. . Nature 412:198–202.

Rezaie P, Trillo-Pazos G, Greenwood J, Everall IP, Male DK (2002), Motility and ramification of human fetal microglia in culture: an investigation using time-lapse video microscopy and image analysis. . Exp Cell Res 274:68–82.

Ribeiro Xavier AL, Kress BT, Goldman SA, Lacerda de Menezes JR, Nedergaard M (2015), A Distinct Population of Microglia Supports Adult Neurogenesis in the Subventricular Zone. Journal of Neuroscience 35:11848-11861.

Rigato C, Buckinx, R., Le-Corronc, H., Rigo, J.M., Legendre, P. (2011), Pattern of invasion of the embryonic mouse spinal cord by microglial cells at the time of the onset of functional neuronal networks. Glia 59:675–695.

Rigato C, Swinnen N, Buckinx R, Couillin I, Mangin JM, Rigo JM, Legendre P, Le CH (2012), Microglia proliferation is controlled by P2X7 receptors in a pannexin-1-Independent manner during early embryonic spinal cord invasion. . J Neurosci 32:11559–11573.

Rios M, Fan G, Fekete C, Kelly J, Bates B, Kuehn R, Lechan RM, Jaenisch R (2001), Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. Molecular Endocrinology (Baltimore, Md) 15:1748-1757.

Rodrigues RJ, Tome AR, Cunha RA (2015), ATP as a multi-target danger signal in the brain. Front Neurosci 9:148.

Rogers JT, Morganti JM, Bachstetter AD, Hudson CE, Peters MM, Grimmig BA, Weeber EJ, Bickford PC, et al. (2011), CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 31:16241-16250.

Roumier A, Béchade C, Poncer J-C, Smalla K-H, Tomasello E, Vivier E, Gundelfinger ED, Triller A, et al. (2004), Impaired Synaptic Function in the Microglial KARAP/DAP12-Deficient Mouse. The Journal of Neuroscience 24:11421-11428.

Roumier A, Pascual O, Béchade C, Wakselman S, Poncer J-C, Réal E, Triller A, Bessis A (2008), Prenatal Activation of Microglia Induces Delayed Impairment of Glutamatergic Synaptic Function. PLoS ONE 3:e2595.

Rousset CI, Chalon S, Cantagrel S, Bodard S, Andres C, Gressens P, Saliba E (2006), Maternal exposure to LPS induces hypomyelination in the internal capsule and programmed cell death in the deep gray matter in newborn rats. . Pediatr Res 59:428–433.

Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J (2011), Three Groups of Interneurons Account for Nearly 100% of Neocortical GABAergic Neurons. Developmental neurobiology 71:45-61.

Rymo SF, Gerhardt, H., Wolfhagen, S.F., Lang, R., Uv, A., Betsholtz, C. (2011), A two- way communication between microglial cells and angiogenic sprouts regulates angiogenesis in aortic ring cultures. PLoS One 6:e15846.

Salter M, Beggs S (2014), Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. Cell 158:15-24.

Samokhvalov IM, Samokhvalova NI, Nishikawa S (2007), Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis. . Nature 446:1056–1061.

Santello M, Bezzi P, Volterra A (2011), TNFα controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal dentate gyrus. Neuron 69:988-1001.

Schafer DP, Heller, C.T., Gunner, G., Heller, M., Gordon, C., Hammond, T., Wolf, Y., Jung, S., Stevens, B., (2016), Microglia contribute to circuit defects in Mecp2 null

mice independent of microglia-specific loss of Mecp2 expression. . Elife 5

Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, et al. (2012), Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. Neuron 74:691-705.

Schafer DP, Lehrman EK, Stevens B (2013), The "quad-partite" synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. Glia 61:24-36.

Schilling T, Nitsch R, Heinemann U, Haas D, Eder C (2001), Astrocyte-released cytokines induce ramification and outward K+ channel expression in microglia via distinct signalling pathways. . Eur J Neurosci 14:463–473.

Schlegelmilch T, Henke K, Peri F (2011), Microglia in the developing brain: from immunity to behaviour. Curr Opin Neurobiol 21, 5–10 21:5–10.

Schmidt MJ, Mirnics K (2015), Neurodevelopment, GABA System Dysfunction, and Schizophrenia. Neuropsychopharmacology 40:190-206.

Schmidtmayer J, Jacobsen C, Miksch G, Sievers J (1994), Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: membrane currents. . Glia 12:259–267.

Schnell L, Fearn S, Klassen H, Schwab ME, Perry VH (1999), Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. . Eur J Neurosci 11:3648–3658.

Schulz C, Gomez PE, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, et al. (2012), A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. Science 336:86–90.

Schwarz JM, Bilbo SD (2012), Sex, glia, and development: interactions in health and disease. . Horm Behav 62:243–253.

Scianni M, Antonilli L, Chece G, Cristalli G, Di Castro MA, Limatola C, Maggi L (2013), Fractalkine (CX3CL1) enhances hippocampal N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) function via D-serine and adenosine receptor type A2 (A2AR) activity. Journal of Neuroinflammation 10:108.

Sedel F, Bechade C, Vyas S, Triller A (2004), Macrophage-derived tumor necrosis factor alpha, an early developmental signal for motoneuron death. J Neurosci 24:2236–2246.

Shatz CJ (1990), Competitive interactions between retinal ganglion cells during prenatal development. . J Neurobiol 21:197–211.

Shatz CJ (2009), MHC class I: an unexpected role in neuronal plasticity. . Neuron 64:40–45.

Shemer A, Erny D, Jung S, Prinz M (2015), Microglia Plasticity During Health and Disease: An Immunological Perspective. Trends Immunol 36:614-624.

Sheridan GK, Murphy KJ (2013), Neuron-glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3CR1 take centre stage. Open Biol 3:130181.

Shigematsu N, Nishi A, Fukuda T (2018), Gap Junctions Interconnect Different Subtypes of Parvalbumin-Positive Interneurons in Barrels and Septa with Connectivity Unique to Each Subtype. Cerebral Cortex.

Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y, Sato K (2014), Microglia Enhance Neurogenesis and Oligodendrogenesis in the Early Postnatal Subventricular Zone. Journal of Neuroscience 34:2231-2243.

Shklover J, Levy-Adam F, Kurant E (2015), Apoptotic cell clearance in development. . Current Topics in Developmental Biology:297–334.

Shklyar B, Sellman Y, Shklover J, Mishnaevski K, Levy-Adam F, Kurant E (2014), Developmental regulation of glial cell phagocytic function during Drosophila embryogenesis. . Dev Biol 393:255–269.

Sierra A, Abiega O, Shahraz A, Neumann H (2013), Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. Frontiers in Cellular Neuroscience 7:6.

Sierra A, de Castro F, del Río-Hortega J, Rafael Iglesias-Rozas J, Garrosa M, Kettenmann H (2016), The “Big-Bang” for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia: 1919 Río-Hortega Papers on Microglia. Glia 64:1801-1840.

Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M (2010), Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. Cell Stem Cell 7:483-495.

Sierra A, Tremblay M-Ã, Wake H (2014), Never-resting microglia: physiological roles in the healthy brain and pathological implications. Frontiers in Cellular Neuroscience 8.

Sievers J, Parwaresch R, Wottge HU (1994), Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: morphology. . Glia 12:245–258.

Sipe GO, Lowery, R. L., Tremblay M-è, Kelly EA, Lamantia CE, Majewska AK (2016), Microglial P2Y12 is necessary for synaptic plasticity in mouse visual cortex. Nature Communications 7:10905.

Šišková Z, Tremblay M-E (2013), Microglia and synapse: interactions in health and neurodegeneration. Neural Plast.

Smith SEP, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH (2007), Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. . J Neurosci 27:10695–11702.

Smolders S, Kessels S, Smolders SM-T, Poulhes F, Zelphati O, Sapet C, Brône B (2018), Magnetofection is superior to other chemical transfection methods in a microglial cell line. Journal of Neuroscience Methods 293:169-173.

Smolders S, Notter T, Smolders SMT, Rigo J-M, Brône B (2018), Controversies and prospects about microglia in maternal immune activation models for neurodevelopmental disorders. Brain, Behavior, and Immunity.

Smolders S, Smolders, S.M.T., Swinnen, N., Gärtner, A., Rigo, J.-M., Legendre, P., Brône, B. (2015), Maternal immune activation evoked by polyinosinic: polycytidylic acid does not evoke microglial cell activation in the embryo. . Front Cell Neurosci 9:301.

Smolders S, Swinnen N, Kessels S, Arnauts K, Smolders S, Le Bras B, Rigo J, Legendre P, et al. (2017), Age-specific function of α5β1 integrin in microglial migration during early colonization of the developing mouse cortex. Glia 65:1072-1088.

Sofroniew NJ, Svoboda K (2015), Whisking. Current Biology 25:R137-R140.

Spassky N, de CF, Le BB, Heydon K, Queraud-LeSaux F, Bloch-Gallego E, Chedotal A, Zalc B, et al. (2002), Directional guidance of oligodendroglial migration by class 3 semaphorins and netrin-1. J Neurosci 22:5992–6004.

Squarzoni P, Oller G, Hoeffel G, Pont-Lezica L, Rostaing P, Low D, Bessis A, Ginhoux F, et al. (2014), Microglia modulate wiring of the embryonic forebrain. Cell Reports 8:1271-1279.

Squarzoni P, Oller G, Hoeffel G, Pont-Lezica L, Rostaing P, Low D, Bessis A, Ginhoux F, et al. (2014), Microglia modulate wiring of the embryonic forebrain. Cell Rep 8:1271-1279.

Staiger JF (2004), Functional Diversity of Layer IV Spiny Neurons in Rat Somatosensory Cortex: Quantitative Morphology of Electrophysiologically Characterized and Biocytin Labeled Cells. Cerebral Cortex 14:690-701.

Staiger JF, Zuschratter W, Luhmann HJ, Schubert D (2009), Local circuits targeting parvalbumin-containing interneurons in layer IV of rat barrel cortex. Brain Struct Funct 214:1-13.

Stellwagen D, Beattie EC, Seo JY, Malenka RC (2005), Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 25:3219-3228.

Stephan AH, Barres BA, Stevens B (2012), The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. . Annu Rev Neurosci 35:369–389.

Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, et al. (2007), The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. . Cell 131:1164–1178.

Sun JJ, Luhmann HJ (2007), Spatio-temporal dynamics of oscillatory network activity in the neonatal mouse cerebral cortex. Eur J Neurosci 26:1995-2004.

Sun Q-Q, Huguenard JR, Prince DA (2006), Barrel Cortex Microcircuits: Thalamocortical Feedforward Inhibition in Spiny Stellate Cells Is Mediated by a Small Number of Fast-Spiking Interneurons. The Journal of Neuroscience 26:1219-1230.

Sun Q-Q, Zhang Z, Sun J, Nair AS, Petrus DP, Zhang C (2014), Functional and structural specific roles of activity-driven BDNF within circuits formed by single spiny stellate neurons of the barrel cortex. Frontiers in Cellular Neuroscience 8.

Swinnen N, Smolders S, Avila A, Notelaers K, Paesen R, Ameloot M, Brone B, Legendre P, et al. (2013), Complex invasion pattern of the cerebral cortex bymicroglial cells during development of the mouse embryo. Glia 61:150-163.

Takahashi K, Naito M, Takeya M (1996), Development and heterogeneity of macrophages and their related cells through their differentiation pathways. Pathol Int 46 473–485.

Tan H, Cao J, Zhang J, Zuo Z (2014), Critical role of inflammatory cytokines in impairing biochemical processes for learning and memory after surgery in rats. . J Neuroinflamm 11:93.

Thion MS, Garel S (2017), On place and time: microglia in embryonic and perinatal brain development. Current Opinion in Neurobiology 47:121-130.

Trang T, Beggs S, Wan X, Salter MW (2009), P2X4-Receptor-Mediated Synthesis and Release of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Microglia Is Dependent on Calcium and p38-Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. Journal of Neuroscience 29:3518-3528.

Tremblay M-È, Lowery RL, Majewska AK (2010), Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience. PLoS Biology 8.

Tremblay M-È, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A (2011), The role of microglia in the healthy brain. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 31:16064-16069.

Trigo FF, Bouhours B, Rostaing P, Papageorgiou G, Corrie JET, Triller A, Ogden D, Marty A (2010), Presynaptic miniature GABAergic currents in developing interneurons. Neuron 66:235-247.

Truman LA, Ford CA, Pasikowska M, Pound JD, Wilkinson SJ, Dumitriu IE, Melville L, Melrose LA, et al. (2008), CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. Blood 112:5026–5036.

Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Kikuta J, Ishii M, Yamashita T (2013), Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. Nature neuroscience 16:543-551.

Ulmann L, Hatcher JP, Hughes JP, Chaumont S, Green PJ, Conquet F, Buell GN, Reeve AJ, et al. (2008), Up-Regulation of P2X4 Receptors in Spinal Microglia after Peripheral Nerve Injury Mediates BDNF Release and Neuropathic Pain. Journal of Neuroscience 28:11263-11268.

Upender MB, Naegele JR (1999), Activation of microglia during developmentally regulated cell death in the cerebral cortex. Dev Neurosci 21:491–505.

Upton AL, Salichon N, Lebrand C, Ravary A, Blakely R, Seif I, Gaspar P (1999), Excess of serotonin (5-HT) alters the segregation of ispilateral and contralateral retinal projections in monoamine oxidase A knock-out mice: possible role of 5- HT uptake in retinal ganglion cells during development. . J Neurosci 19:7007– 7024.

Vainchtein ID, Chin G, Cho FS, Kelley KW, Miller JG, Chien EC, Liddelow SA, Nguyen PT, et al. (2018), Astrocyte-derived interleukin-33 promotes microglial synapse engulfment and neural circuit development. Science 359:1269-1273.

Valiullina F, Akhmetshina D, Nasretdinov A, Mukhtarov M, Valeeva G, Khazipov R, Rozov A (2016), Developmental Changes in Electrophysiological Properties and a Transition from Electrical to Chemical Coupling between Excitatory Layer 4 Neurons in the Rat Barrel Cortex. Front Neural Circuits 10:1.

van Berckel BN, Bossong MG, Boellaard R, Kloet R, Schuitemaker A, Caspers E, Luurtsema G, Windhorst AD, et al. (2008), Microglia activation in recent-Onset schizophrenia: a quantitative (R)-[11C] PK11195 positron emission tomography study. . Biol Psychiatry 64:820–822.

van Kleef ES, Gaspar P, Bonnin A (2012), Insights into the complex influence of 5- HT signaling on thalamocortical axonal system development. . Eur J Neurosci 35:1563–1572.

VanRyzin JW, Yu SJ, Perez-Pouchoulen M, McCarthy MM (2016), Temporary Depletion of Microglia during the Early Postnatal Period Induces Lasting Sex-Dependent and Sex-Independent Effects on Behavior in Rats. eNeuro 3.

Veinante P, Jacquin MF, Deschênes M (2000), Thalamic projections from the whisker-sensitive regions of the spinal trigeminal complex in the rat. J Comp Neurol 420:233-243.

Verkhratsky A, Butt A (2007) Glial Neurobiology. Wiley.

Verney C, Monier A, Fallet-Bianco C, Gressens P (2010), Early microglial colonization of the human forebrain and possible involvement in periventricular white-matter injury of preterm infants. J Anat 217:436–448.

Vilhardt F, Haslund-Vinding, J., Jaquet, V., Mcbean, G. (2016), Microglia antioxidant systems and redox signalling. Br J Pharmacol

Voineagu I, Wang X, Johnston P, Lowe JK, Tian Y, Horvath S, Mill J, Cantor RM, et al. (2011), Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. Nature 474:380-384.

von Bartheld CS, Bahney J, Herculano-Houzel S (2016), The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. Journal of Comparative Neurology 524:3865-3895.

Waisman A, Ginhoux F, Greter M, Bruttger J (2015), Homeostasis of Microglia in the Adult Brain: Review of Novel Microglia Depletion Systems. Trends Immunol 36:625-636.

Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J (2009), Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 29:3974-3980.

Wakselman S, Bechade C, Roumier A, Bernard D, Triller A, Bessis A (2008), Developmental Neuronal Death in Hippocampus Requires the Microglial CD11b Integrin and DAP12 Immunoreceptor. Journal of Neuroscience 28:8138-8143.

Wang J, Wegener, J.E., Huang, T., Sripathy, S., De Jesus-Cortex, H., Xu, P., Tran, S., Al, E., (2015), Wild-type microglia do not reverse pathology in mouse models of Rett syndrome. . Nature 521:E1–E4.

Wang Y, Szretter KJ, Vermi W, Gilfillan S, Rossini C, Cella M, Barrow AD, Diamond MS, et al. (2012), IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. Nat Immunol 13:753–760.

Weinhard L, Bartolomei Gd, Bolasco G, Machado P, Schieber NL, Neniskyte U, Exiga M, Vadisiute A, et al. (2018), Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. Nature Communications 9:1228.

Welker E, Van der Loos H (1986), Quantitative correlation between barrel-field size and the sensory innervation of the whiskerpad: a comparative study in six strains of mice bred for different patterns of mystacial vibrissae. J Neurosci

Wollmer MA, Lucius R, Wilms H, Held-Feindt J, Sievers J, Mentlein R (2001), ATP and adenosine induce ramification of microglia in vitro. . J Neuroimmunol 115:19–27.

Woolsey TA, Van der Loos H (1970), The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. Brain Res Dev Brain Res 17:205-242.

Wright CL, Burks SR, McCarthy MM (2008), Identification of prostaglandin E2 receptors mediating perinatal masculinization of adult sex behavior and neuroanatomical correlates. . Dev Neurobiol 68:1406–1419.

Wright CL, McCarthy MM (2009), Prostaglandin E2-induced masculinization of brain and behavior requires protein kinase A AMPA/kainate, and metabotropic glutamate receptor signaling. . J Neurosci 29:13274–13282.

Wu C, Sun D (2015), GABA receptors in brain development, function, and injury. Metabolic brain disease 30:367-379.

Xenos D, Kamceva M, Tomasi S, Cardin JA, Schwartz ML, Vaccarino FM (2017), Loss of TrkB Signaling in Parvalbumin-Expressing Basket Cells Results in Network Activity Disruption and Abnormal Behavior. Cerebral Cortex:1-15.

Xu D-X, Chen Y-H, Wang H, Zhao L, Wang J-P, Wei W (2006), Tumor necrosis factor alpha partially contributes to lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal growth restriction and skeletal development retardation in mice. . Toxicol Lett 163:20–29.

Xu J, Wang T, Wu Y, Jin W, Wen Z (2016), Microglia colonization of developing zebrafish midbrain is promoted by apoptotic neuron and lysophosphatidylcholine. . Dev Cell 38:214–222.

Yamada J, Hayashi Y, Jinno S, Wu Z, Inoue K, Kohsaka S, Nakanishi H (2008), Reduced synaptic activity precedes synaptic stripping in vagal motoneurons after axotomy. . Glia 56:1448–1462.

Yamamoto N, Hanamura K (2005), Formation of the Thalamocortical Projection Regulated Differentially by BDNF- and NT-3-Mediated Signaling. Reviews in the Neurosciences 16.

Yanagisawa T, Tsumoto T, Kimura F (2004), Transiently higher release probability during critical period at thalamocortical synapses in the mouse barrel cortex: relevance to differential short-term plasticity of AMPA and NMDA EPSCs and possible involvement of silent synapses. European Journal of Neuroscience 20:3006-3018.

Yeo W, Gautier J (2004), Early neural cell death: dying to become neurons. Dev Biol 274:233–244.

Yu C, Derdikman D, Haidarliu S, Ahissar E (2006), Parallel thalamic pathways for whisking and touch signals in the rat. PLoS Biol 4:e124.

Zhan Y, Paolicelli RC, Sforazzini F, Weinhard L, Bolasco G, Pagani F, Vyssotski AL, Bifone A, et al. (2014), Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. Nature neuroscience 17:400-406.

Zhang Z, Jiao Y-Y, Sun Q-Q (2011), Developmental maturation of excitation and inhibition balance in principal neurons across four layers of somatosensory cortex. Neuroscience 174:10-25.

Annexe : “*Microglia in CNS development: shaping the brain for the future*”

Progress in Neurobiology 149–150 (2017) 1–20

Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Neurobiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pneurobio

Review article

Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future

Coralie-Anne Mosser[a,b,1], Sofia Baptista[a,b,1], Isabelle Arnoux[c,1], Etienne Audinat[a,b,*]

[a] Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1128 Paris, France
[b] Laboratory of Neurophysiology and New Microscopies, Paris Descartes University, France
[c] Johannes Gutenberg University, Institute of Microscopic Anatomy and Neurobiology, Focus Group Translational Neuroscience, Mainz, Germany

ARTICLE INFO

Article history:
Received 24 October 2016
Received in revised form 24 January 2017
Accepted 24 January 2017
Available online 28 January 2017

Keywords:
Macrophage
Neuron
Synapse
Pre- and postnatal development
Inflammation
Neurodevelopmental disorder

ABSTRACT

Microglial cells are the resident macrophages of the central nervous system (CNS) and are mainly known for their roles in neuropathologies. However, major recent developments have revealed that these immune cells actively interact with neurons in physiological conditions and can modulate the fate and functions of synapses. Originating from myeloid precursors born in the yolk sac, microglial cells invade the CNS during early embryonic development. As a consequence they can potentially influence neuronal proliferation, migration and differentiation as well as the formation and maturation of neuronal networks, thereby contributing to the entire shaping of the CNS. We review here recent evidence indicating that microglial cells are indeed involved in crucial steps of the CNS development, including neuronal survival and apoptosis, axonal growth, migration of neurons, pruning of supernumerary synapses and functional maturation of developing synapses. We also discuss current hypotheses proposing that diverting microglial cells of their physiological functions, by promoting the expression of an immune phenotype during development, may be central to neurodevelopmental disorders such as autism, schizophrenia and epilepsy.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction . . . 2
   1.1. Resident macrophages of the CNS . . . 2
   1.2. Never resting microglia surveying the healthy CNS . . . 2
2. Origin and development of microglia . . . 3
   2.1. Invaders from another world . . . 3
   2.2. Colonizing the CNS parenchyma . . . 5
3. Microglial regulation of developmental cell death and survival . . . 8
   3.1. Killing and cleaning during CNS development . . . 8
   3.2. Supporting survival and proliferation of developing neurons . . . 9
4. Microglial regulation of synaptic network development . . . 9
   4.1. Early wiring of the CNS . . . 9
   4.2. Synaptic refinement . . . 10
      4.2.1. A. synaptic pruning . . . 10
      4.2.2. Formation and functional maturation of synapses . . . 11
5. Long term consequences of microglial actions on neurons during development: is microglia the missing link in developmental pathologies? 12

Abbreviations: BDNF, Brain-derived neurotrophic factor; CX3CL1, Fractalkine; CX3CL1, Fractalkine receptor; CSF, Colony-stimulating factor; dLGN, dorsal lateral geniculate nucleus; E, embryonic day; IFN, Interferon; IL, Interleukin; IGF-1, Insulin growth factor-1; MIA, Maternal immune activation; MMP, : matrix metalloproteinase; P, postnatal day; PCD, programmed cell death; TGF, Transforming growth factor; TLR, : Toll Like Receptor; TNF, Tumor necrosis factor; VZ/SVZ, ventriculat/sub-ventricular zone; YS, Yolk sac.

* Correspondence to: Inserm U1128, Université Paris Descartes, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris, France.
E-mail address: etienne.audinat@parisdescartes.fr (E. Audinat).

[1] Equal contribution.

http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.01.002
0301-0082/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

6. Conclusions and perspectives . . . 14
Conflict of interest . . . 15
Acknowledgments . . . 15
References . . . 15

1. Introduction

Microglial cells constitute a sub-population of the resident macrophages of the central nervous system (CNS). As perivascular and meningeal macrophages, but unlike choroid plexus macrophages, microglial cells derive from hematopoietic precursors during embryonic development and establish stable populations (Goldmann et al., 2016). However, unlike all other mononuclear macrophages associated with the CNS, microglial cells are in direct contact and interact with neurons, synapses and other glial cells in the CNS parenchyma (Frost and Schafer, 2016; Kettenmann et al., 2013; Nayak et al., 2014; Prinz and Priller, 2014; Schafer et al., 2013; Tremblay et al., 2011; Wu et al., 2013). In line with their immune cell identity, microglial cells have been primarily studied in pathological conditions and, until recently, our knowledge on these cells was mostly derived from analyses of CNS pathologies in human and in animal models. In this introduction we will first briefly summarize our current knowledge on microglia in pathological conditions and then discuss recent experimental evidence that has modified our view of the role of these immune cells in physiological conditions in the adult CNS.

1.1. Resident macrophages of the CNS

Microglial cells are involved in a large number of CNS diseases and very often they are mobilized at early stages of the disease. This mobilization leads to changes of their phenotype, classically named microglia activation, which allows microglia to react and adapt in a specific manner to the new environment (Hanisch and Kettenmann, 2007; Ransohoff and Perry, 2009; Shemer et al., 2015). In the adult CNS, microglia activation was first described as a morphological change: from a small soma with long and thin ramified processes in physiological conditions, they adopt a less ramified morphology with fewer and thicker processes in pathological conditions, which can eventually lead to an amoeboid morphology, without process, in the most severe cases (Fig. 1A). We know now that these morphological changes are accompanied by important functional modifications including changes in gene expression and motility properties, increased proliferation and phagocytic activity and release of numerous pro- and anti-inflammatory mediators (Hanisch and Kettenmann, 2007; Kierdorf and Prinz, 2013; Ransohoff and Perry, 2009). Yet, microglia activation is not an all-or-none process; it is progressive, depends on the actual pathological conditions and on the context in which the disease appears. There is therefore not a single activation state but a diversity of phenotypes that are determined by a fine detection of environmental cues and that allows microglial cells to perform specific functions in different pathological conditions (Fig. 1A) (Hanisch and Kettenmann, 2007; Kierdorf and Prinz, 2013; Ransohoff and Perry, 2009). Thus, the terms activation or activated states are misleading in the sense that they may suggest that in all pathological conditions microglial cells will always acquire the same phenotype, the so-called activated/activation state, which is certainly not the case.

By analogy with the two-state model of macrophage polarization in non-neural tissues (*i.e.* peripheral macrophages), several authors have adopted a M1 (pro-inflammatory and neurotoxic)/M2 (anti-inflammatory and neuroprotective) classification of reactive microglia (Boche et al., 2013). However, the most recent observations indicate that this two-state model does not describe the actual diversity of reactive states (Heppner et al., 2015; Martinez and Gordon, 2014; Prinz and Priller, 2014; Ransohoff, 2016). Notably, this M1/M2 classification is now also seriously questioned for peripheral macrophages (Ginhoux et al., 2015; Murray et al., 2014). Although the actual mechanisms underlying the changes in microglia phenotype are not fully elucidated, several signaling pathways are known to modulate the expression of this process. In particular, neuronal signals have been tentatively classified as “off” or “on” signaling pathways according to their mode of actions: “off” signals are constitutively expressed, keeping microglia in a non-reactive state and antagonizing pro-inflammatory activity; “on” signals are inducible and constitute warning signals (Biber et al., 2007). Thus, disappearance of “off” signals and appearance of “on” signals favor microglia activation. However, both classes of signals can control beneficial and detrimental functions of microglia. It is beyond the aim of this review to describe all the known signaling pathways that determine changes in microglial cell phenotype and readers can refer to several reviews that have been published on this matter (Hanisch and Kettenmann, 2007; Kettenmann et al., 2011; Kierdorf and Prinz, 2013; Ransohoff and Perry, 2009). Nevertheless, we will briefly discuss in the following paragraph the case of fractalkine, as this neuronal chemokine, which is one of the most widely studied “off” signal in the adult brain, has also known roles during development (see following sections 3, 4 and 5 and (Arnoux and Audinat, 2015)).

The chemokine fractalkine (or CX3CL1) is expressed only by neurons and its only known receptor, CX3CR1, is exclusively expressed by microglia in the CNS parenchyma (Cardona et al., 2008). A large body of evidence indicates that the CX3CL1/R1 pathway constitutively inhibits microglia activation. In several animal models of neuropathologies, including stroke, amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson and Alzheimer diseases, CX3CL1 or CX3CR1 deficiency leads to an increased production of pro-inflammatory mediators, such as interleukin-1β (IL-1β), and of reactive oxygen species (ROS) that trigger cell death (Cardona et al., 2006; Cho et al., 2011; Morganti et al., 2012; Sheridan and Murphy, 2013). It is worth noting though that many of these studies were based on the use of constitutive knockout mice for fractalkine or for its receptor, assuming that this deficiency would have no influence in physiological conditions. We know now that fractalkine signaling influences the normal development of the CNS (see Sections 4 and below and (Arnoux and Audinat, 2015; Paolicelli et al., 2014)) and that adult CX3CR1 knockout mice are impaired in several physiological brain functions (Rogers et al., 2011; Zhan et al., 2014). It would therefore be important to re-examine the role of this signaling pathway in pathological conditions in light of what we now understand of the role of fractalkine and microglia during development. The case of fractalkine illustrates nicely that the activation of a given signaling pathway in microglial cells can have a variety of outcomes depending on the environment, including developmental stages.

1.2. Never resting microglia surveying the healthy CNS

During the last decade, the development of new tools for functional analysis and of new animal models has completely changed our view of microglia functions in physiological conditions. In 2005, two landmark papers using *in vivo* two-photon

microscopy in anesthetized knock-in CX3CR1-eGFP mice revealed that microglial cells in physiological conditions are not resting, as previously thought, but are permanently extending and retracting their thin processes (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). This patrolling activity of microglial processes may help to detect more rapidly danger signals appearing in the parenchyma. These two articles actually showed that in response to laser lesions or to local applications of ATP, which is considered as an alarm signal (Rodrigues et al., 2015), microglial cells rapidly extend their processes toward the lesion or the source of ATP, which acts here as a chemoattractant (Fig. 1A). Although other signaling pathways may control the oriented motility of microglia processes, purinergic P2Y12 receptors and adenosine A2A receptors are instrumental for rapid process extension and retraction, respectively, occurring right after an insult to the CNS parenchyma (Haynes et al., 2006; Orr et al., 2009). Following these initial observations, other groups showed that during their surveillance of the parenchyma microglial cell processes contact synapses. The occurrence and duration of these contacts are regulated by neuronal network activity and can influence the fate and activity of the synapses (Li et al., 2012; Pfeiffer et al., 2016; Sipe et al., 2016; Tremblay et al., 2010; Wake et al., 2009). Interestingly, microglial cells promote the formation of new spines in the cortex of animals engaged in a motor learning task (Parkhurst et al., 2013). In parallel, several studies also showed that mobilization of microglia specific pathways could lead to the modulation of synaptic activity. This is the case for instance of fractalkine, which regulates excitatory synaptic transmission and plasticity in the hippocampus (Rogers et al., 2011; Scianni et al., 2013) but also of microglial Toll Like Receptor (TLR) 4 signaling, which controls glutamate release probability of presynaptic fibers indirectly through the mobilization of astrocytes (Pascual et al., 2012). Recently, it was also shown that microglial P2Y12 receptors are necessary for synaptic plasticity during the critical period of ocular dominance (Sipe et al., 2016). These influential studies have led to the notion that microglial cells monitor but also regulate synaptic and neuronal activity in the healthy brain (Schafer et al., 2013; Tremblay et al., 2011). These observations also suggest that profound changes in microglia phenotype upon appearance of pathological conditions will have two consequences: i) the loss of the constitutive influence of surveying microglia and ii) the emergence of new interactions in relation with the immune nature of these cells. However, there is a large variety of conditions where attributes of surveying and of activated microglia co-exist. For instance, phagocytic activity is largely considered as a characteristic of activated macrophages, including microglia. Yet, microglial cells of the dentate gyrus phagocyte adult neuronal precursors generated in physiological conditions and this occurs without the appearance of any other sign of activation (Sierra et al., 2010). This illustrates the extreme plasticity of microglial cells that makes it hard to predict their actual phenotype and role in a given condition based on our knowledge from other models. From this point of view, the study of microglial cells during CNS development represents a real challenge since their phenotype is constantly evolving from amoeboid cells, when entering the CNS parenchyma at embryonic stages, to fully ramified cells at juvenile stages. Remarkably, at a given stage of development, microglial cells with different morphological (and probably functional) phenotypes are differentially distributed in different areas of the CNS. This reflects the dynamics of microglia colonization of the brain and their exceptional ability to adapt to their environment, which explains the tight coupling between their own maturation and the maturation of other components of the CNS. This variety of phenotypes predicts a variety of functions in the developing CNS. In the following paragraphs we will review how microglia invade and mature in the developing CNS, how they interact with other developing brain cells and influence the formation of neuronal and synaptic networks, and how they may contribute to the progression of neurodevelopmental diseases.

2. Origin and development of microglia

2.1. Invaders from another world

The origin of microglial cells differs from that of other cells of the CNS parenchyma and identifying the precise origin and lineage of these invaders of the CNS has been a source of debate for many years. During the late 19th and the early 20th centuries F Nissl, W Robertson, Ramon Y Cajal and Pio del Rio-Hortega already proposed a mesodermal origin of these cells (for a review and references see (Ginhoux et al., 2013); see also the recent translations of Pio del Rio-Hortega papers (Sierra et al., 2016)). During the second half of the 20th century, two hypotheses were discussed. The first one supporting a common neuroectodermal origin with neurons and other glial cells was proposed on the basis of experiments in culture system or of transplantation of adult bone marrow cells (De Groot et al., 1992; Fedoroff et al., 1997; Fujita et al., 1981; Hao et al., 1991). The second one postulated that microglial cells derived from hematopoietic cells (*i.e.* monocytes), which give rise to the macrophages of peripheral tissue (Kaur et al., 1987; Ling, 1994). However, most recent evidence that will be reviewed in the following paragraphs now support the idea that microglial cells derived from primitive macrophages originating in the extra-embryonic yolk sac (YS), which is the first site of hematopoiesis (Fig. 2). The primitive hematopoiesis occurs in the YS around embryonic day (E) 7 in mice and contributes to the production of erythrocytes and macrophages (Bertrand et al., 2005; Palis et al., 1999). The primitive hematopoiesis decreases during the embryonic development and is gradually replaced by the definitive hematopoiesis which takes place in the aorta, gonads and mesonephros (AGM) regions at E10.5 (Ginhoux et al., 2013). Progenitors resulting from the definitive hematopoiesis establish themselves transiently in the fetal liver, which produces all the hematopoietic cells after E11.5 during embryonic life. After birth these cells are produced by the bone marrow (Hoeffel and Ginhoux, 2015).

The primitive macrophages appeared in the blood islands of the YS and they propagate in the embryo through the blood after the establishment of the circulatory system (around E8 and E10). The study of Ncx-1$^{-/-}$ mouse embryos, deficient for Na^+/Ca^{2+} exchangers, revealed that the circulatory system is required for the migration of macrophages (Ginhoux et al., 2010). Indeed, microglia precursors do not migrate in these Ncx-1-deficient embryos lacking heartbeat and functional blood circulation. However, this deficiency did not affect the primitive hematopoiesis taking place in the YS because Ncx-1$^{-/-}$ embryos display a similar number of macrophages compared to control embryos. Therefore, primary macrophages colonize different tissues such as the developing CNS and they differentiate in fetal macrophages through a non-monocytic pathway (Takahashi et al., 1996). Fate mapping experiments also support the notion that YS macrophages give rise to adult microglial cells. Indeed, Samokhalov and collaborators have developed a mouse line expressing an inducible Cre recombinase under the Runx1 (Runt-related transcription factor 1) promoter, a transcription factor implicated in the development of all hematopoietic cell lineages (Samokhvalov et al., 2007). Crossing this mouse line with ROSA26-stop-EYFP or ROSA26-stop-LacZ mouse lines, Ginhoux and co-workers found that Runx1 expression is restricted to blood islands of the YS before E8. The induction of Cre recombinase expression at E7.5 labels 30% of YS macrophages (due to a partial efficiency of recombination) allowing to determine the fate of macrophages born in the YS at

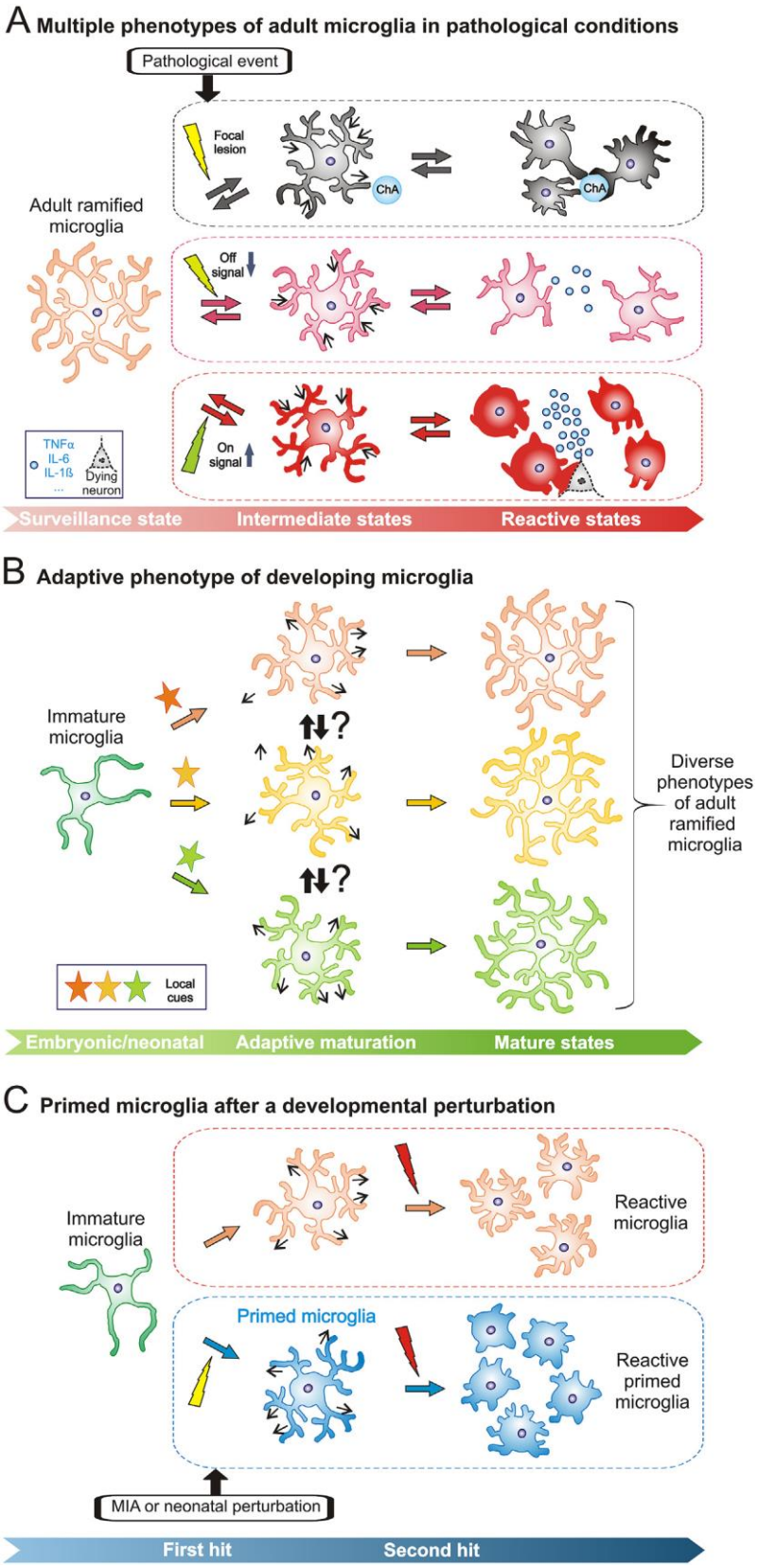


Fig. 1. Multiple phenotypes of microglia. (A) Microglia activation in the adult brain. Under physiological conditions, microglial cells are highly ramified and continuously scan the neuronal parenchyma with their motile processes. Upon a homeostatic disturbance, and depending on the nature of the stimuli, microglial cells acquire different phenotypes that can include morphological changes (increased soma size and process retraction), transcriptome and proteome remodeling, targeted cell or process motility toward a lesion site, proliferation, phagocytosis and release factors, such as cytokines, growth factors or ROS. (B) Microglia phenotypes during normal embryonic and postnatal development. The maturation of microglia during development follows a general pattern, from immature amoeboid or poorly ramified cells to fully ramified surveilling microglia. However, local cues differently expressed in space and time during development can direct microglia toward different phenotypes that may lead to the

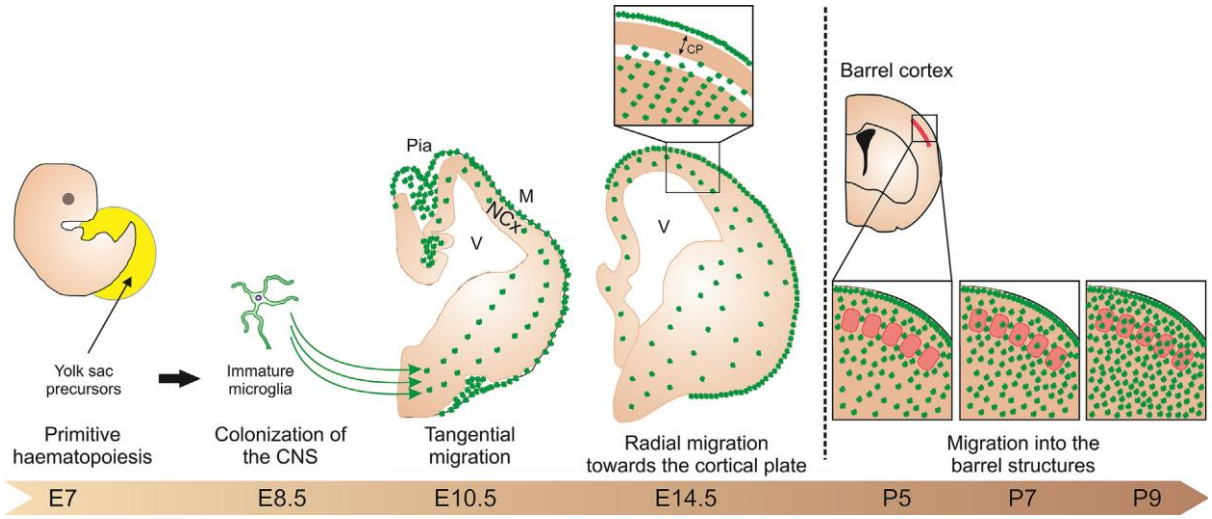


Fig. 2. Colonization of the developing CNS by microglia. Precursors of microglia are born in the yolk sac at early embryonic stages, E7 in the mouse. They invade the CNS from E8.5 and then follow tangential and radial migration pathways to colonize all CNS regions. In the whisker-related barrel field of the somatosensory cortex, microglial cells migrate radially to populate the different layers. The barrels of layer 4 contain the thalamocortical synapses encoding the sensory information of individual whiskers and are formed at P3. Microglial cells enter the barrels only after P5 to interact with thalamocortical synapses and influence their functional maturation. The distribution of microglial cells in layer 4 becomes homogeneous only after the beginning of the second postnatal week.
CP: cortical plate, M: meninges, NCx: neocortex, V: ventricle.

this period and the progeny. The analysis of these mice at different embryonic days indicates that a similar proportion of labelled YS macrophages and microglia was found at E10 and E13 (around 30%). In addition, 30% of microglia was labelled in adult mice when the Cre recombinase was activated at E7.5. This identical proportion of recombined cells among YS macrophages found in the brain at embryonic stages and among adult microglia makes it unlikely that unmarked precursor cells will invade lately the CNS to differentiate into microglia (Ginhoux et al., 2010). However, a recent study suggested the existence of a wave of fetal liver-derived monocytes that infiltrate the brain, peaking at P3, but are thereafter rapidly depleted by apoptosis and do not contribute to the final microglial population (Askew et al., 2017).

The analysis of other factors that control the differentiation of cells deriving from the primitive and from the definitive hematopoiesis also supports the idea that the origin of microglia differs from that of other macrophages. For example, the transcription factor Myb is dispensable for the development of YS macrophages but is required for that of hematopoietic stem cells of the definitive hematopoiesis (Schulz et al., 2012). In addition, Kierdorf et al. showed that microglial cells derived from CD45 and c-kit positive cells found at E8 in the YS, giving birth to microglia precursors expressing CX3CR1, CD45 and F4/80 and surrounding the neural tube at E9 (Kierdorf et al., 2013). The survival and the development of microglia precursors depend on the expression of the transcription factor Pu.1 (also known as Sfpi) (Kierdorf et al., 2013) and are regulated by colony-stimulating factor (CSF)-1R (Erblich et al., 2011; Ginhoux et al., 2010) and its ligand IL-34 (Greter et al., 2012; Wang et al., 2012). The interferon regulatory factor (IRF) 8, which is a constitutively produced nuclear factor in microglia, is also a crucial transcriptional determinant of the phenotype of these cells (Minten et al., 2012). Primitive macrophages from the YS migrate in the whole embryo after the establishment of the circulatory system. They can be detected in the whole embryo at early stages of the development but they will only persist in the CNS where they will differentiate into microglia through a process that requires TGF-β. This growth factor defines the molecular and functional signature of adult human and rodent microglia but is also necessary for the differentiation and maintenance of microglia during embryonic development (Butovsky et al., 2014). Interestingly, maintenance of microglial cells in adulthood is also regulated, with a coupling between proliferation and apoptosis that determines a rapid turnover, and this regulation is dependent on CSF-1R signaling (Askew et al., 2017; Elmore et al., 2014).

In the embryonic human CNS, the first microglial cells entering the brain parenchyma follow three routes: the meninges, choroid plexus and ventricles (Verney et al., 2010). In rodents, the ventricle entry route involves the microglial NADPH oxidase Nox2, which generates superoxide ions, regulates CSF-1R/VEGFR1-mediated microglia chemotaxis and promotes the infiltration of microglia into the subventricular zone of the cortex (Lelli et al., 2013). This developmental role of microglial NADPH oxidase Nox2 signaling contrasts with its neurotoxic effects in pathological conditions (Chen et al., 2016; Vilhardt et al., 2016). Another signaling pathway promoting the recruitment and clustering of microglia into germinal niches of the developing cortex (*i.e.* the ventricular/sub-ventricular zone; VZ/SVZ) involves the production of the chemokine CXCL12 by intermediate progenitors (Trb2 + cells), which favors the recruitment of microglia in the SVZ (Arno et al., 2014).

2.2. Colonizing the CNS parenchyma

Once in the CNS parenchyma amoeboid microglial cells migrate according to a spatio-temporal pattern specific to their entry

diversity observed in the adult CNS. (C) An embryonic or neonatal perturbation (first hit) can lead to long lasting modifications of microglia phenotype. This new phenotype may not have functional consequences until the occurrence of a second hit. The phenotype acquired by microglia after the second hit is determined by the occurrence of the first hit.
ChA: source of chemoattractant.

pathway and they first accumulate in clusters located near or within developing white-matter where they proliferate actively (Verney et al., 2010). Further colonization of these cells proceeds in two phases (Fig. 2). The first phase corresponds to the tangential migration when the cells migrate alongside to the surface to distribute in a uniform layer in all CNS regions. It has been reported that these microglia precursors migrate along radial glial feet and axonal bundles in retina, optic tectum, cortex and cerebellum (Cuadros and Navascues, 2001; Pont-Lezica et al., 2011). During a second phase of migration, microglial cells migrate perpendicularly to CNS surface to reach all the brain layers (Fig. 2). In the developing cortex, they move toward the subcortical plate and they accumulate in the junction of the cortical plate and pre-subplate (Monier et al., 2007). This subplate layer contains mature neurons that are connected to the thalamus by afferent axons penetrating the developing cortex (Allendoerfer and Shatz, 1994). Then, microglial cells invade the cortical plate to reach their final destination.

At early stages of development, microglial cells show an amoeboid morphology without or with few processes (Fig. 1B), which is characteristic of immature microglia and facilitate their migration (Monier et al., 2007; Rigato et al., 2011). Their locomotor behavior resembles that of fibroblasts in cell culture and consists in a polarized extension at the leading edge of the cell, a translocation of the nucleus and a retraction of the rear (Marin-Teva et al., 1998; Swinnen et al., 2013).

The migration of microglial cells could be facilitated by interactions with adhesion molecules located on blood vessels and/or with components of the extracellular matrix. During the embryonic development, the colonization of the CNS by microglia coincides with the CNS vascularization (E10 in rodents) and a close relationship between microglia and vascular sprouts could be implicated in microglial migration (Earle and Mitrofanis, 1998; Monier et al., 2006; Rigato et al., 2011). This association between microglia and blood vessels is also observed in upper cortical layers at early postnatal stages (Arnoux et al., 2013). In addition, the growth of vessels can be stimulated by the release of soluble microglial factors (Rymo et al., 2011). Consequently, animals showing few or no microglia (*e.g. Pu.1*$^{-/-}$ mice) display an undeveloped vascular network. Thus, although microglia and blood vessels are likely to influence reciprocally their development, the signaling mechanisms involved in these interactions are still unclear. In the embryonic spinal cord for instance, tight appositions between microglia and radial glia have been observed, suggesting that the latter may also guide the tangential migration of the former (Rigato et al., 2011). Furthermore, microglial expression of matrix metalloproteinases (MMPs) that can remodel the extracellular matrix contributes to the regulation of microglia migration during embryogenesis. In particular, the expression of MMP-8 and −9 plays a key role in the spreading of microglia and MMP inhibition impairs microglia expansion (Kierdorf et al., 2013).

Similarly to the migration of oligodendrocytic cells, the migration of the microglial cells could be guided by a gradient of guiding cues such as semaphorins and netrins (Spassky et al., 2002) but also by chemoattracting molecules such as MCP1, MIP-1alpha (Rezaie et al., 2002), CXCL12 (Arno et al., 2014) or ligands of CSF-1R and VGEFR1 (Lelli et al., 2013). In the postnatal CNS, other neuronal factors help microglial cells to reach their final destination in the CNS parenchyma. This is the case of the neuronal chemokine fractalkine, the receptor of which, CX3CR1, is only expressed in microglia (see Section 1). In CX3CR1 knockout mice the recruitment of microglial cells in the early postnatal hippocampus and somatosensory cortex is delayed by several days (Hoshiko et al., 2012; Paolicelli et al., 2011). These observations could be explained by a chemoattractant effect of fractalkine or by an alteration of the microglial motility in knockout mice (Arnoux and Audinat, 2015; Liang et al., 2009). Finally, although this has not been studied specifically, purinergic microglial receptors P2 × 4 and P2Y12 could also be involved in regulating chemoattractant-driven cell mobility during development (Haynes et al., 2006; Ohsawa et al., 2007).

There is evidence that some of the factors attracting microglia during development originate from neurons undergoing apoptosis. During both embryonic and postnatal development, the CNS undergoes a massive cell death known as programmed cell death (PCD), which targets proliferating as well as post-mitotic neurons, and which is necessary for tissue homeostasis, morphogenesis and for proper circuitry development (reviewed by (Yeo and Gautier, 2004)). PCD results from the overproduction of neurons during development and from their competition for survival and trophic factors (Oppenheim, 1991). The hypothesis that microglial cells are attracted by apoptotic cells is first supported by the chronologic coincidence between the developmental neuronal death and the entry of microglia in some brain areas (Ashwell, 1990; Marin-Teva et al., 1999b; Perry et al., 1985), although mismatches between the distributions of microglia and of apoptotic cells have been observed (Ashwell, 1990). Yet, close association between microglial cells and apoptotic neurons has been observed in the neocortex (Upender and Naegele, 1999), the cerebellum (Marin-Teva et al., 2004), the retina (Hume et al., 1983; Moujahid et al., 1996), hippocampus (Dalmau et al., 1998; Wakselman et al., 2008) and spinal cord (Rigato et al., 2011; Sedel et al., 2004) of rodent as well as in the human telencephalon (Rakic and Zecevic, 2000). Several "find-me" signals secreted by apoptotic cells are known to attract peripheral macrophages and can potentially be responsible for attracting microglia during developmental PCD (Fig. 3A). This is the case of the chemokine fractalkine (Truman et al., 2008), the lipid lysophosphatidylcholine (Lauber et al., 2003), sphingosine 1 phosphate (Gude et al., 2008) and the nucleotides ATP and UTP (Elliott et al., 2009). Recently, Xu and co-workers confirmed this hypothesis and showed that microglia colonization of the zebrafish optic tectum was promoted by apoptotic neurons and lysophosphatidylcholine (Xu et al., 2016).

Despite these observations supporting a link between PCD and microglia distribution in the developing CNS, it is clear, however, that the distribution of microglial cells is not entirely determined by the distribution of apoptotic cells since mismatches between the two distributions have been reported (Ashwell, 1990). Moreover, recent experiments performed on BAX null mice, in which PCD is impaired, indicated that CNS colonization by microglia is independent of neuronal apoptosis (Eyo et al., 2015).

Active proliferation of microglial cells is another important process contributing to the colonization of the cerebral parenchyma by these immune cells (Alliot et al., 1991; Dalmau et al., 2003). This proliferative activity of amoeboid microglia has been observed during embryonic development in several structures, such as the spinal cord (Rigato et al., 2012, 2011), corpus callosum (Imamoto and Leblond, 1978), retina (Marin-Teva et al., 1999a), hippocampus and cortex (Dalmau et al., 2003). This proliferation is regulated by several signaling molecules including GM-CSF, CSF-1, NT-3, IL-4 and IL-5 (for review (Navascues et al., 2000)). In the embryonic VZ/SVZ, cell death promotes microglia proliferation through a MIF dependent process (Arno et al., 2014). Microglia proliferation continues also during early post-natal development (Arnoux et al., 2013; Dalmau et al., 2003) but decreases progressively and is almost negligible during the second postnatal week in rodents, in agreement with the very low proliferation level of adult mature microglia (Marin-Teva et al., 1999a).

After proliferation and migration, microglial cells located at their final destination gradually differentiate into ramified microglia. The mechanisms directing the conversion toward a mature phenotype are still poorly understood. Nevertheless, studies in cell

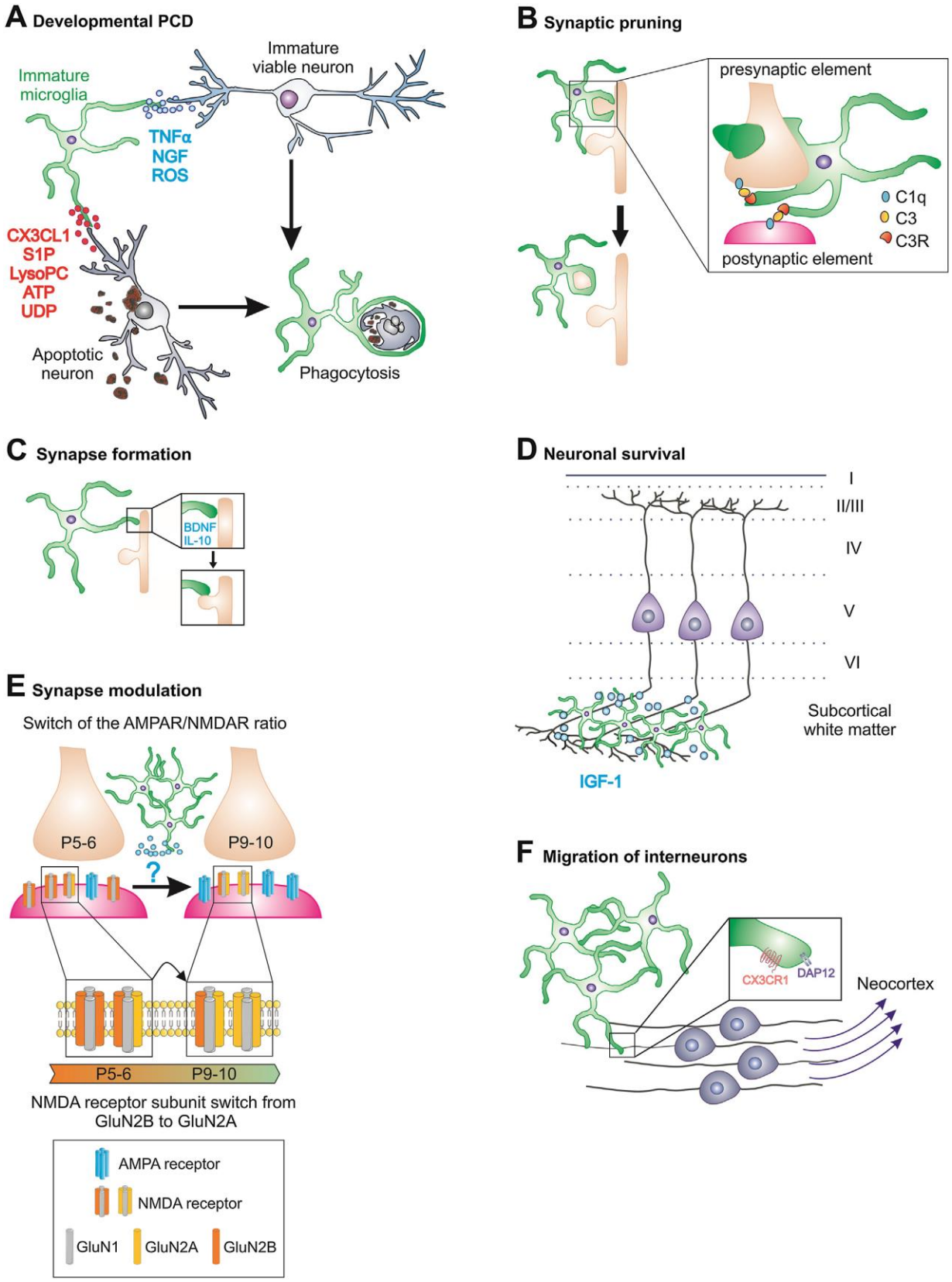


Fig. 3. Main microglial functions during CNS development. (A) Phagocytosis of apoptotic neurons expressing "eat me" signals (red) and induction of neuronal apoptosis through different signaling pathways (blue). (B) Pruning of supernumerary weak synapses tagged by proteins of the complement cascade. (C) Formation of new synapses mediated by BDNF or IL-10 signaling. (D) Survival of layer 5 pyramidal neurons through the release of IGF-1 in the white matter. (E) Regulation of the functional expression of synaptic AMPA and NMDA receptors at thalamocortical synapses of the barrel cortex. (F) CX3CR1- and DAP12-dependent control of the production and migration of cortical inhibitory interneurons.

cultures highlighted the role of astrocytes in facilitating microglia morphological and functional maturation. Microglial cells cultured on a monolayer of astrocytes develop processes after 5- 7 days, followed by their elongation and branching to create a well-defined territory around the soma (Sievers et al., 1994). Induction of microglia ramification is also observed upon application of astrocyte conditioned medium, in the absence of physical contacts between microglia and astrocytes, and purines (ATP and adenosine) and cytokines (TGF-β, M-CSF and GM-CSF) are involved in this effect (Schilling et al., 2001; Sievers et al., 1994; Wollmer et al., 2001). Electrophysiological properties of microglia evolve when they become more ramified. Immature amoeboid microglial cells are characterized by the expression of inward K^+ currents whereas maturating microglia in postnatal development expressed few inward K^+ channels and transient outward K^+ channels; adult microglial cells in physiological conditions show almost no voltage-gated currents (Arnoux et al., 2013; Avignone et al., 2008; Boucsein et al., 2000; Brockhaus et al., 1993; Menteyne et al., 2009; Rigato et al., 2012). In cultured cells, these functional changes are also determined by astrocytic diffusible factors (Schmidtmayer et al., 1994), among which TGF-β controls the up-regulation of outward K^+ currents (Schilling et al., 2001). Recently, transcriptome analysis identified TGF-β as a major regulator of the acquisition of the molecular and functional phenotype of mature human and rodent microglial cells (Butovsky et al., 2014). This work showed that the gene expression pattern of mature microglia is acquired after postnatal day (P) 4, and differs from the expression pattern of other myeloid cells, including macrophages recruited into the brain in pathological conditions, of microglial cell lines and of cultured microglial cells. These results further strength the complexity to extrapolate observations made on microglia in simplified models (*e.g.* cell cultures) to *in situ* situations. Moreover, adult microglial cells from different CNS regions have diverse transcriptome profiles and functional properties (Grabert et al., 2016; Hart et al., 2012; Schnell et al., 1999). Although this latter point has not yet been analyzed during early development, it is very likely that reciprocal interactions between microglia and other brain cells during development generate some heterogeneity in microglia phenotypes (Fig. 1B). This heterogeneity should be taken into consideration in studies on the development of these highly plastic and adaptive cells.

In conclusion, it seems rather clear now that microglial cells in the healthy adult CNS are all derived from embryonic precursors generated during the primitive hematopoiesis and not from circulating monocytes derived from bone marrow precursors. It should be emphasized, however, that a contribution of embryonic precursors from another source than the YS cannot be totally excluded. The CNS colonization and differentiation of microglial cells are regulated by a large array of signaling pathways involving interactions with other CNS cells and seems tightly coupled with the maturation of neural networks. It is worth mentioning that in the rodent telencephalon, the distribution of microglial cells remains heterogeneous until the end of the first postnatal week (Arnoux et al., 2013) and microglia density reaches a peak during the second postnatal week before decreasing and stabilizing at adult levels only by the end of the first postnatal month (Nikodemova et al., 2015; Paolicelli et al., 2011). The mechanisms responsible for this drop in microglia density are yet to be identified but it is interesting to note that microglial cells acquire their adult transcriptome profile only when their density has started to decrease (Matcovitch-Natan et al., 2016). Finally, it should be highlighted that the vast majority of the studies on microglia colonization of the CNS were based on analyses of microglia distribution at given time points of the development and not on live imaging studies that could bring richer information on the dynamics of this colonization (see for instance (Swinnen et al., 2013)).

3. Microglial regulation of developmental cell death and survival

3.1. Killing and cleaning during CNS development

The immune cell identity of microglial cells and their well-known role as professional phagocytes in pathological conditions motivated many studies to explore their involvement in PCD that occurs during development.

As abovementioned (Section 3.2), several "find-me" signals released by apoptotic neurons can contribute to the recruitment of microglial cells in specific regions during embryonic and early postnatal development (Fig. 3A). Once they have reached the source of the "find-me" signals, macrophages are then stimulated by "eat-me" signals that are usually ligands exposed at the membrane of apoptotic cells. The most evolutionary conserved "eat-me" signal is phosphatidylserine (PS), which is normally maintained in the inner leaflet of the membrane bilayer and get exposed to the outer leaflet in apoptotic cells (reviewed in (Shklover et al., 2015)). Other "eat-me" signals for microglia have been reviewed in details elsewhere (Sierra et al., 2013) and include components of the complement system (Fig. 3B) and thrombospondin. In addition, UDP resulting from the hydrolysis of UTP can bind P2Y6 microglial receptors and stimulates phagocytosis (Koizumi et al., 2007).

The capacity of microglia to phagocyte apoptotic cells during development is usually high but region-specific, with efficiencies varying between 18 and 100% at the peak of the PCD in different brain regions (Ashwell, 1990; Caldero et al., 2009; Dalmau et al., 2003; Marin-Teva et al., 2004; Wakselman et al., 2008). Other cell types, notably of the astrocyte lineage, contribute to the phagocytosis of apoptotic cells (reviewed in (Sierra et al., 2013)). Analysis of the coupling between apoptosis and phagocytosis during *Drosophila* development has led to the suggestion that the phagocytosis ability of professional phagocytes is established independently and ahead of PCD, which may explain the very rapid and efficient elimination of apoptotic cells (Shklyar et al., 2014). Another possibility is that PCD is actually promoted by phagocytes. In the case of microglial cells, several studies have shown that during development they can release mediators that promote cell death (Fig. 3). In the chick retina, microglia-derived nerve growth factor (NGF) triggers cell death at early embryonic developmental stages, before synaptogenesis occurs (Frade and Barde, 1998). In explants of the embryonic rat spinal cord, macrophage-derived tumor necrosis factor (TNF) α commit motoneurons to die before the beginning of PCD. *In vivo*, macrophage TNFα and motoneuronal TNF receptor 1 (TNFR1) are specifically expressed at E12-13, but not later on, *i.e.* two days before PCD (Sedel et al., 2004). Cerebellar Purkinje cells undergo PCD at early postnatal stages that can be revealed by TUNEL staining but also by caspase-3 immunostaining at postnatal day 3 (Marin-Teva et al., 2004). At this stage of development, microglial cells exhibit an amoeboid morphology and present inclusions that are positive for the Purkinje cell selective marker calbindin, suggesting that microglial cells have engulfed and phagocyted Purkinje cells. In addition to this phagocytic activity, experiments in cerebellar slice cultures showed that elimination of microglia strongly reduces Purkinje cell apoptosis that is normally promoted by superoxide ions produced by microglial respiratory burst (Marin-Teva et al., 2004). Microglial superoxide ions are also involved in hippocampal neuron apoptosis (Wakselman et al., 2008). During the first two days of postnatal life in rodents, microglial processes contact most of the apoptotic cells identified by activated caspase-3 and

deficiency in microglial integrin CD11b or immunoreceptor DAP12 decreases neuronal apoptosis and the production of superoxide ions. These studies thus favor the idea that microglia cells induce the apoptosis of the neurons they phagocyte, following a scheme resembling that of engulfment-promoted cell death previously described in *C. elegans* (Hoeppner et al., 2001; Reddien et al., 2001). However, microglial cells also phagocyte viable neural precursors without inducing apoptosis (Cunningham et al., 2013). In proliferative zones of the developing forebrain of monkeys and rats, microglial cells have been shown to engulf neural precursors that do not express markers of apoptosis (cleaved-caspase-3, TUNEL, exposed-PS). Interestingly, eliminating microglia from the fetal cerebral cortex with clodronate liposomes or deactivating microglia *in utero* with tetracyclines increased the number of neural precursors in the SVZ, whereas activating microglia through maternal immune activation (MIA) decreased the number of neural precursors (Cunningham et al., 2013). These observations suggesting that microglial cells primarily restrain the number of neural precursors during normal embryonic development are somehow in contradiction with other reports indicating that microglia cells rather support the production neural precursors in the SVZ, probably through the release of several different cytokines, during normal development (see paragraph 4.2 and (Arno et al., 2014; Shigemoto-Mogami et al., 2014)). The reasons for this discrepancy remain unclear but may be related to the use of different tools to eliminate microglial cells or to manipulate their phenotype. Nevertheless these studies clearly show that conditions that will change microglia number or phenotype during perinatal stages will impact on the number of neural precursors.

In conclusion, microglial cells intervene on different aspects of developmental cell death: as expected from professional phagocytes, they remove dying or dead cells but it is also clear now that they induce cell death, either by triggering apoptosis through the release of mediators, or by directly phagocytosing viable neural precursors. The signaling pathways involved in microglial phagocytosis of apoptotic cells during development have been the focus of many studies (reviewed in (Shklover et al., 2015)). However, those responsible for microglial phagocytosis of non-apoptotic cells, or phagoptosis, during development remain elusive (reviewed in (Brown and Neher, 2014)).

3.2. Supporting survival and proliferation of developing neurons

During CNS development, neurons require trophic support to survive and to be integrated in neuronal circuits. In addition to its killing-and-cleaning role during development, there is also evidence that microglial cells sustain the survival and proliferation of neurons.

In primary cultures of embryonic mesencephalic and cortical neurons, microglial conditioned medium increases neurotransmitter uptake and the number of mature neurons. This suggests that microglial cells have a neurotrophic effect via the release of diffusible factors (Nagata et al., 1993a,b), probably derived from plasminogen (Nagata et al., 1993a,b). Microglia purified from embryonic rat brain promote neurite outgrowth of cultured neuronal cells through the release of the extracellular matrix protein thrombospondin (Chamak et al., 1994). Interestingly, thrombospondin, which is found up to second postnatal week in microglia (Chamak et al., 1995), is also highly expressed by astrocytes and promotes synaptogenesis (Christopherson et al., 2005). Conditioned medium from microglial cultures also increases proliferation of cultured cerebellar granule cells through mitogen activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and delta-Notch signaling cascades (Morgan et al., 2004). Along the same line, proliferation of neural precursors is decreased in cultures prepared from embryonic Pu.1 knockout mice that lack microglia. Interestingly, astrogenesis is also decreased in cultures of Pu.1 knockout mice and both astrogenesis and proliferation of neuronal precursors were rescued by addition of naïve microglia to the cultures (Antony et al., 2011).

More recently, Ueno and collaborators reported clear evidence for a trophic action of microglia on developing neurons *in vivo* (Ueno et al., 2013). They used different approaches, including inhibiting microglia activation with minocycline, transient genetic depletion of microglia, with Cd11b-DTR mice, and CX3CR1 knockout mice to show that activated microglial cells located in the subcortical white matter, on the trajectory of layer 5 pyramidal cell axons, promote the survival of these output cortical neurons at early postnatal stages (Fig. 3D). Although the interpretation of minocycline experiments is questionable, in particular at these stages of development (Arnoux et al., 2014), this study also provided *in vitro* and *in vivo* evidence that this trophic action of microglia is due to the release of the Insulin growth factor-1 (IGF-1). As mentioned above (Section 4.1), amoeboid microglial cells located in the underlying SVZ at same early postnatal stages support neurogenesis (and oligogenesis) (Arno et al., 2014; Shigemoto-Mogami et al., 2014). However, this action does not involve IGF-1 but the release of IL-1β, IL-6, TNFα and IFN-γ (Shigemoto-Mogami et al., 2014).

Altogether, these findings indicate that microglial cells regulate the number of neurons produced and maintained in the developing CNS by acting on the proliferation, the survival and the death of progenitors and maturing neurons. The quantitative importance of these processes in establishing the final number of neurons that will be eventually integrated in functional networks remains unclear. The most recent experiments attempting to deplete microglia cells during embryonic development reported significant but nevertheless restricted modifications of the density and distribution of cortical neurons postnatally (Squarzoni et al., 2014). Whether these modest effects reflect a minimal influence of microglia in regulating the final number of neurons or the occurrence of compensatory mechanisms upon depletion of microglia cells remains to be established. Finally, it is worth mentioning also that microglial cells regulate the fate of neuroblasts in adult neurogenic niches (Ekdahl, 2012; Ribeiro Xavier et al., 2015; Sierra et al., 2010).

4. Microglial regulation of synaptic network development

Outside of the CNS, peripheral macrophages play important roles in organogenesis (Pollard, 2009). It is therefore not surprising that microglial cells contribute to the regulation of neuronal death and survival during CNS development. The fact that microglial cells also contribute to the building up of synaptic networks and in particular to the activity dependent refinement of these networks is somehow more original and relies on the exquisite ability of these immune cells to adapt to their environment.

4.1. Early wiring of the CNS

As described above, in the embryonic CNS of various species, including humans, microglial cells adopt a specific and heterogeneous distribution (Ashwell, 1989; Cuadros et al., 1997; Dalmau et al., 2003; Degos et al., 2010; Herbomel et al., 2001; Hoshiko et al., 2012; Rigato et al., 2011; Schlegelmilch et al., 2011; Squarzoni et al., 2014; Swinnen et al., 2013; Verney et al., 2010). In particular, higher densities of microglial cells are observed on several, but not all, developing axonal tracts (Squarzoni et al., 2014). This is the case in particular of dopaminergic axons, the outgrowth of which is modified by microglia depletion, disruption of microglial signaling pathways or MIA. Interestingly, microglia depletion and MIA have opposite effects, microglia depletion favoring an exuberant dorsal

extension of dopaminergic axons whereas MIA restricts this dorsal extension but is associated with a pronounced ventral increase of dopaminergic innervation. Confocal and electron microscopies revealed the occurrence of direct contacts between microglial processes and dopaminergic axons and the presence of dopaminergic axons fragments inside the cytoplasm of microglia at E14.5. This latter observation may suggest that microglial cells control axon extension through phagocytic activity although a quantification of dopaminergic axon engulfment is still required to sustain such a hypothesis (Squarzoni et al., 2014). Remarkably, neighboring serotoninergic axons are not contacted and are not affected by microglia, indicating that the control of axon outgrowth by microglia in this brain area is rather specific of dopaminergic fibers (Squarzoni et al., 2014). Yet, embryonic microglial cells interact with the development of other fiber tracts in the developing CNS. In particular, recent evidence indicates that prenatal inflammation, loss-of-function of the microglial-specific signaling molecule DAP12 or the absence of microglia in Pu.1 knockout mice lead to the defasciculation of axons in the dorsal corpus callosum (Pont-Lezica et al., 2014). The observation that this defasciculation occurs in the 3 studied models in which microglial phagocytosis is impaired (DAP12 mutant) or increased (MIA) or microglial cells are absent (*Pu.1* knockout), together with the transcriptional profiling of microglia suggested that this effect on the development of the corpus callosum is due to a trophic role rather than to the phagocytic activity of microglia (Pont-Lezica et al., 2014). Release of microglial signaling molecules and more specifically of extracellular guiding cues may also be responsible for the role of embryonic microglia on positioning of interneurons in the forebrain. Manipulations of microglia identical to those affecting dopaminergic axon outgrowths impair the distribution of future inhibitory interneurons in the cortical plate (Fig. 3F), leading to an increased number of parvalbumin-expressing interneurons in upper cortical layers of P20-old mice (Squarzoni et al., 2014). In marked contrast with the role of microglia on dopaminergic axon outgrowth (see above) or on the control of neural precursor cell number (see above Sections 3 & 4), microglia depletion and MIA have the same effect on interneuron distribution. This suggests that inflammation during embryonic life can totally prevent microglial cells from achieving their normal functions.

Besides these analyses that have focused on the anatomical/morphological development of the CNS, it has been also shown that prenatal alterations of microglial functions have also an impact on synaptic functions probed at postnatal stages. Prenatal manipulations of microglia, through genetic or pharmacological approaches, induce an alteration of the function of glutamatergic excitatory synapses in the hippocampus of adult mice (Roumier et al., 2008, 2004). Interestingly, BDNF/TrkB signaling may be involved in these microglia-to-neuron interactions (Roumier et al., 2004). Altogether, these studies indicate that microglial cells contribute to the normal embryonic development of the CNS and that modification of their activity at these stages can have long term consequences on the correct arrangement and function of synaptic networks. The actual mechanisms through which embryonic microglial cells carry out these functions remain to be identified.

4.2. Synaptic refinement

At postnatal stages, microglial cells contribute to the refinement of synaptic networks and to the functional maturation of synapses (Hoshiko et al., 2012; Paolicelli et al., 2011; Schafer et al., 2012; Zhan et al., 2014). During CNS development, there is an overproduction of synaptic contacts and mature synaptic networks are formed through an activity-dependent refinement of this template, leading to the elimination of supernumerary inappropriate synapses and to the functional maturation of the remaining appropriate ones (Hua and Smith, 2004).

4.2.1. A. synaptic pruning

In the adult CNS, the contribution of microglia to the elimination of synapses was first observed in pathological conditions where microglial cell processes separate synaptic terminals from the cell body of motoneurons after facial nerve injury (Blinzinger and Kreutzberg, 1968). This phenomenon named synaptic stripping may be initiated by an initial decrease in synaptic activity (Yamada et al., 2008). But adult microglial cells also have the ability to eliminate synapses via phagocytosis, and this process can also be regulated by activity (Reviewed in (Sierra et al., 2014; Šišková and Tremblay, 2013). These observations together with the new findings indicating that microglial cells were constantly interacting with synapses in physiological conditions (see Section 2.2 in introduction) motivated studies aiming at testing the role of microglia in the elimination of supernumerary synapses during development. Using quantitative and 3D electron microscopy as well as two-photon microscopy *in vivo*, Tremblay and co-workers showed that sensory deprivation (i.e. dark adaptation) during the critical period of the visual cortex development in juvenile mice increases the occurrence of cellular inclusions and the prevalence of phagocytic structures in microglia of the visual cortex (Tremblay et al., 2010). This was the first evidence for a microglial role in phagocytic engulfment of synapses in non-pathological conditions during late stages of postnatal development. The group of Cornelius Gross then reported that microglial cells also engulf synaptic elements in the hippocampus of mice during the first postnatal weeks (Paolicelli et al., 2011). Using electron and STED microscopy, they visualized immunostained markers of excitatory post-synaptic density (PSD-95) and of pre-synaptic terminals (SNAP25) in the cytoplasm of microglial cells. This suggests that microglial cells phagocyte synaptic elements during the first postnatal weeks of the hippocampus development. They went on by showing that pruning of supernumerary dendritic spines during the postnatal development of the hippocampus was delayed in CX3CR1 knockout mice in which microglial cells are recruited lately during development. These observations suggest that microglial cells invading the hippocampus during development prune excitatory synapses and that if their recruitment is delayed, as in CX3CR1 knockout mice, this pruning will be delayed. Interestingly, several functional properties of excitatory synapses did not mature properly in CX3CR1 knockout mice (Paolicelli et al., 2011; Zhan et al., 2014). Although the persistence of these immature synaptic properties could be a consequence of the deficit in synaptic pruning, it may also be linked to the many other microglia abnormalities observed in these mutant mice (Arnoux et al., 2013; Arnoux and Audinat, 2015; Pagani et al., 2015; Paolicelli et al., 2014; Rogers et al., 2011).

A role of microglial cells in contributing to the activity-dependent elimination of supernumerary synapses has also been further supported by examining the retinogeniculate system, a classical model for studying developmental synapse elimination (Shatz, 1990). In the developing dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN), the binocular retinal ganglion cell inputs from both eyes overlap until the end of the first week of postnatal development in rodents and are rearranged thereafter to occupy eye-specific regions in the dLGN. This process called eye specific segregation involves an intense and selective pruning of projections and it has been demonstrated that the classical complement pathway (Stevens et al., 2007) and microglial cells contribute to eliminate selectively inappropriate and weak synapses (Schafer et al., 2012). At P5, microglial cells engulf inappropriate pre-synaptic elements of retinogeniculate projections through an activity-dependent process and these elements are later found in the lysosomal

compartment of microglial cells. The interactions between microglia and unwanted synapses are mediated by classical complement cascade. In the innate immune system, complement proteins C1q and C3 serve as identification signals allowing the removal of material by phagocytic cells (Stephan et al., 2012). Deficiency of microglial receptor CR3 or neuronal ligands C1q or C3 decreases synapse pruning and the reduction of synapse elimination induces a deficit of retinogeniculate projection segregation which can be observed on the long term in the adult brain (Schafer et al., 2012). Interestingly, tagging of unwanted retino-thalamic fibers may be determined by TGFβ signaling in the retina between astrocytes and ganglion cells (Bialas and Stevens, 2013).

Other signaling pathways are involved in the refinement of retinogeniculate connections during postnatal development. Serotonin (5-HT) is known to control sensory map formation (van Kleef et al., 2012). Eye-specific segregation of retinal projections in the thalamus is dependent on 5-HT level that, when increased, leads to incorrect segregation of ipsilateral and contralateral fibers (Upton et al., 1999). During postnatal development, microglial cells express 5-HT2B receptors that promote process extension toward a source of serotonin. Moreover, knockout mice for 5-HT2B receptors ($Htr2_B^{-/-}$) display defects in synaptic refinement of retinal projections and anatomical alterations of ipsilateral projections (Kolodziejczak et al., 2015). These observations suggest that 5-HT signaling could recruit microglia to eliminate unwanted synapses. Yet, 5-HT2B receptors are expressed by other cell types in the dLGN and further studies are needed to confirm that deficiency in 5-HT2B receptors in microglia is responsible for the deficit observed in $Htr_{2B}^{-/-}$ mice. Finally, molecules of the major histocompatibility complex class I (MHC I) also regulate axonal remodeling, synapse elimination and synaptic learning rules in the dLGN (Lee et al., 2014; Shatz, 2009). Because microglia express membrane proteins known to interact with MHC I receptors (e.g. DAP12), it has been proposed that microglia can identify neuronal MHC I signals as a tag leading to synapse elimination. Yet, the involvement of microglia in the MHC I modulation of retinogeniculate connections during development has not been specifically studied.

4.2.2. Formation and functional maturation of synapses

Besides phagocytosis, it is now clear that microglial cells influence synapse functions through the release of specific mediators (Bechade et al., 2013; Salter and Beggs, 2014). In the adult CNS, this has been studied mostly in pathological conditions but we know now that this also occurs in physiological conditions (Eyo and Wu, 2013; Tremblay et al., 2011). Moreover, as reported in the above section 4, during development microglial cells control neuronal death and survival through the release of growth factors and cytokines. Microglial release of mediators controlling the maturation of synaptic circuits may therefore represent an important aspect of microglia functions during development. This may explain for instance how microglial cells induce the formation of new spines on developing cortical neurons (Miyamoto et al., 2016). In layer 2–3 of the somatosensory cortex, two-photon imaging of awake mice showed that contacts established between microglial processes and dendritic shafts of pyramidal neurons favor the formation of filopodia. This filopodia formation occurs only between P8 and P10, a developmental stage of intense synaptogenesis in upper cortical layers and genetic ablation of microglia between P5 and P11 decreases the spine density measured at P11. Interestingly, this effect of microglia in promoting spine formation in upper cortical layer at this stage of development affects mostly synapses formed by ascending axons of layer 4 neurons (Miyamoto et al., 2016). The mechanism responsible for this formation of new spines in the developing cortex remains to be established but the secretion of a microglial soluble factor maybe involved. Indeed, the formation of new synapses can be promoted by microglial interleukin IL-10 in cultures (Lim et al., 2013). Moreover, in adult but also in juvenile (i.e. 3rd postnatal week) mice depletion of microglia impairs the turnover of spines on pyramidal neurons of the motor cortex, with an effect on both elimination and formation of spines (Parkhurst et al., 2013). The effect on the formation of new spines was reproduced when knocking out BDNF specifically in microglia, suggesting that microglial secretion of this growth factor promoted the formation of new spines in the neocortex (Parkhurst et al., 2013).

The release of mediators by microglia could also be involved in the functional maturation of excitatory thalamocortical synapses in the barrel field of the primary somatosensory cortex (Hoshiko et al., 2012). The barrel field is the cortical representation of the rodent whiskers, each barrel located in layer 4 of the somatosensory cortex corresponding to a single whisker on the snout of the animal. The barrels start to form at P3-4 by the clustering of thalamocortical axons that will occupy the center of each barrel and will be surrounded by the cell body of layer 4 stellate cells, representing the barrel walls. The center of each barrel is thus the location where thalamic terminals form synapses on the dendrites of layer 4 neurons. Microglial cells follow a very specific pattern of invasion when colonizing layer 4 of the barrel field: Up to P5, microglia cells present in layer 4 do not enter the barrel centers, delineating the periphery of each barrel, and it is only from P6 that microglial cells start to enter the barrel centers (Fig. 2 and Hoshiko et al., 2012). In CX3CR1 knockout mice, this invasion of the barrel centers is delayed by two days. Remarkably, at P7 when microglial cells have not yet invaded the barrel centers of knockout animals, their overall density in layer 4 is not lower than in heterozygous mice for CX3CR1, suggesting that deficiency in fractalkine signaling impairs selectively the recruitment of microglial cells at sites of maturating synapses (Hoshiko et al., 2012). This delayed recruitment of microglia at thalamocortical synapses in CX3CR1 knockout mice is associated with a delayed functional maturation that normally occurs around the end of the first postnatal week of these excitatory synapses: the increase of the ratio of the synaptic component mediated by AMPA receptors over that mediated by NMDA receptors (AMPA/NMDA ratio) and the switch of NMDAR subunits are both impaired (Fig. 3E). Eventually, microglia cells invade the barrel centers of CX3CR1 knockout mice during the second postnatal week and the functional properties of thalamocortical synapses finally match those of heterozygous animals (Hoshiko et al., 2012). These results suggest that recruitment of microglia at maturating synapses influences the functional expression of synaptic receptors. The actual mechanism(s) though which microglial cells regulate the functional maturation of thalamocortical synapses during postnatal development is still unknown. It is worth noting, however, that impaired functional expression of synaptic AMPA and NMDA receptors have been also observed in another mutant mouse with a loss of function of the microglial adaptor protein DAP12 (Roumier et al., 2008, 2004). These observations strongly suggest that, besides pruning, microglial cells also contribute to the maturation of synaptic circuits by exposing neurons to signaling factors that regulate the functional expression of glutamate receptors.

What are the signaling molecules released by microglia that could influence the functional maturation of developing synapses? Among the many candidates, three usual suspects deserve some attention. The first one is brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Using CX3CR1-CreER mice to knockout specifically BDNF in microglia, the group of Wenbiao Gan showed that microglial BDNF facilitates synapse formation (Fig. 3C), controls the expression of synaptic proteins (including AMPA and NMDA receptor subunits) and influences the performance of adult mice during motor learning and fear conditioning (Parkhurst et al., 2013).

Although microglial BDNF contributes a minute fraction of total brain BDNF, the hypothesis is that activity-dependent mechanisms would favor the attraction of microglia processes to synapses involved in a specific learning task, thereby allowing a local release of BDNF onto these targeted synapses. It is therefore attractive to speculate that microglial BDNF may be responsible for the functional maturation of thalamocortical synapses during the development of the barrel cortex (see above). The lower density of microglial cells at these stages of synapse maturation may be, however, a limiting factor in support of a role of microglia through a local release of BDNF (but also by pruning). Yet, in the barrel cortex, their density doubles within 2 days when functional maturation starts (Hoshiko et al., 2012) and although their ramification is less developed at this age (Arnoux et al., 2013) they are endowed with the ability to move not only their processes but also their soma toward a source of ATP (Arnoux and Audinat, 2015). Local BDNF release by microglia could thus be a key mechanism of excitatory synapse maturation during the development.

Tumor necrosis factor alpha (TNFα) is another microglial mediator known to impact synapse functions and could therefore be involved in microglia-dependent synapse maturation during postnatal development. TNFα is implicated in various neuronal functions such as synaptic transmission and synaptic plasticity (Poon et al., 2013). In particular, TNFα *in vitro* increases excitatory synaptic transmission by increasing synaptic expression of AMPA and NMDA receptors (Beattie et al., 2002; Stellwagen et al., 2005). However, microglial TNFα was shown recently to induce the reduction of AMPAR-mediated synaptic currents in medium spiny striatal neurons after repeated cocaine treatment *in vivo* (Lewitus et al., 2016). TNFα can also modulate inhibitory synaptic transmission by promoting the endocytosis of $GABA_A$ receptors, thereby decreasing their functional expression at synaptic membrane (Stellwagen et al., 2005). Interestingly, microglia and astrocytes can cooperate to increase dramatically the production and secretion of TNFα (Bezzi et al., 2001). Although this cooperative action of the two glial cells has been reported so far only in pathological conditions, it is certainly worth investigating whether the specific phenotype of glial cells during development favors the recruitment of signaling mechanisms that are otherwise seen only in pathologies. Thus, microglial TNFα released in the vicinity of maturating synapses could participate in the functional maturation of inhibitory and excitatory circuits.

Interleukin-1β (IL-1β) is a pro-inflammatory cytokine that can be produced by microglia, in addition to other CNS cells. Its expression is dramatically increased in pathological conditions and this cytokine can induce changes in excitatory synaptic transmission by down-regulating the surface expression and phosphorylation of AMPA receptors (Kawasaki et al., 2008; Lai and Todd, 2006; Tan et al., 2014). Low levels of IL-1β present in physiological conditions appear to be required for normal learning and memory (Hirsch et al., 1996; Rachal Pugh et al., 2001). Interestingly, activation of microglial CX3CR1 by fractalkine triggers the release of IL-1β that facilitates synaptic strength in the spinal cord (Clark et al., 2015). Moreover, deficits in hippocampal synaptic plasticity and in cognitive functions of CX3CR1 knockout mice have been rescued by antagonizing IL-1β signaling (Rogers et al., 2011), suggesting that these deficits were the consequence of an overproduction of IL-1β by microglia in CX3CR1 knockout mice. Whether a similar mechanism is responsible for the impairment in synaptic maturation during the postnatal development of CX3CR1 knockout mice (Hoshiko et al., 2012; Paolicelli et al., 2011; Squarzoni et al., 2014) and whether physiological (low) levels of IL-1β produced by microglia are needed for normal synaptic maturation remain to be tested.

The list of microglial mediators potentially influencing synapse development is certainly not restricted to the few examples listed above, and we will see for instance in the following section that prostaglandins should also be considered. Besides a candidate approach, systematic screenings of signaling molecules expressed during development by microglia is crucially needed. Recent genome-wide chromatin and expression profiling coupled with single-cell transcriptomic analysis of microglia throughout development proposed the existence of three stages characterized by discrete transcriptional phases (E10.5 to E14, E14 to P9 and adult) (Matcovitch-Natan et al., 2016). However, functional investigations and transcriptomic analyses have revealed a diversity of microglia phenotypes in different CNS regions of adult animals (Grabert et al., 2016; Hart et al., 2012; Ribeiro Xavier et al., 2015; Schnell et al., 1999) and a functional diversity of microglia can even be observed at a given stage of development within a cortical layer (Arnoux et al., 2013). In the near future, single-cell transcriptomic analysis of microglia will certainly help the identification of more transcriptional phases of developing microglia, revealing the expression of specific signaling molecules associated with specific functions of microglial cells at a specific time and location within a developing brain area.

Finally, microglial cells can also control synaptic maturation indirectly, through the mobilization of other cells and in particular of astrocytes. Indeed, astrocytes are important modulators of synaptogenesis during normal development (Ullian et al., 2004) and, in pathological conditions, they interact with microglia (Verkhratsky et al., 2015). In the juvenile hippocampus and in physiological conditions, mobilization of microglial cells by activation of TLR4 rapidly induces a release of microglial ATP that activates purinergic P2Y1 receptors on astrocytes, thereby potentiating the release of astrocytic glutamate that regulates synaptic strength at Schaffer collaterals CA1synapses (Pascual et al., 2012). Other microglial mediators have their cognate receptors expressed by astrocytes that are also endowed with the possibility to modulate synaptic functions through many signaling pathways (Araque et al., 2014) and to prune synapses in an activity-dependent manner (Chung et al., 2013).

5. Long term consequences of microglial actions on neurons during development: is microglia the missing link in developmental pathologies?

Microglial actions at perinatal stages have long-term consequences on both neuronal network structure and activity. The acquisition of sexual dimorphism in specific brain areas is an example of these long term effects of developing microglia. The sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (POA) of adult male rodents contains more neurons with a higher density of dendritic spines along with astrocytes that are more ramified than in females. These differences arise from the action of estradiol, following aromatization of testosterone, in male pups during a critical period for sex differences in the POA that occurs between P0 and P4 (McCarthy et al., 2015; Schwarz and Bilbo, 2012). In particular, Margaret McCarthy and co-workers showed that a transient estradiol exposure during this critical period leads to an increased production of prostanglandin E2 (PGE2) that in turn increases the trafficking of AMPA receptors and the formation and stabilization of more dendritic spines (Amateau and McCarthy, 2004; Lenz et al., 2011; Wright and McCarthy, 2009). The resulting doubling of the spine density in males compared to females is stable throughout life and is correlated with the expression of male copulatory behavior (Wright et al., 2008). Looking for an explanation of the puzzling observation that a single injection of PGE2 in female pups was sufficient to induce the masculinization of the density of dendritic spines and of the astrocyte complexity in

the POA throughout life, the same group proposed that microglial cells were responsible for the positively reinforcing system maintaining on the long-term the sexual differences acquired or triggered during the critical period (McCarthy et al., 2015). They observed that microglial cells in the POA are more numerous, display more often amoeboid morphologies and produce more PGE2 in males than in females during the critical period. In addition, upon treatment of females with a masculinization dose of estradiol or PGE2, microglial cells in the POA acquire an amoeboid morphology and increase their production of PGE2. Interestingly, these effects of estradiol or PGE2 in females are inhibited by co-treatment with minocycline, which also inhibits the masculinization of adult sexual behavior induced by estradiol (Lenz et al., 2013). These findings therefore suggest that estradiol through PGE2 production in the POA of males induce microglial cells to acquire a specific phenotype that would promote further PGE2 production and lead to the masculinization of the POA synaptic pattern and to the sexual behavior of adult animals. The actual mechanism through which microglial cells influence the POA synaptic pattern remains to be identified. Beyond the effects of minocycline that should be interpreted with cautious in particular at these early stages (see above), identifying the signaling pathway through which microglial cells shape the POA synaptic pattern is necessary to prove definitively their causative role.

Although the role of glial cells in brain sex differences have been the most widely studied in the POA, it should be emphasized that sexual dimorphism in neuronal, astrocytic and microglial phenotype or numbers have been reported in different brain areas of several species, including human (Schwarz and Bilbo, 2012). Interestingly, Bilbo and collaborators proposed that the existence of sex differences in the function of glia may provide a mechanistic basis for the well-known sex differences in the prevalence or severity of many brain pathologies, including psychiatric diseases, which are associated with neurodevelopmental disorders (Hanamsagar and Bilbo, 2016; Schwarz and Bilbo, 2012).

Indeed, if microglial cells actively contribute to the formation and functional maturation of developing networks, any modification of their phenotype during development may have long term consequences on the structure and function of these networks. Thus, microglial cells could contribute to disorders arising from impaired neurodevelopment. Although the role of microglia at the onset of these diseases is not yet firmly established, an increasing number of epidemiological, clinical and pre-clinical studies points toward an involvement of the immune system. Epidemiological studies strongly support an association between maternal virus or bacterial infections (*i.e.* MIA) and the child's subsequent risk to develop pathologies such as schizophrenia, autism spectrum disorders (ASD) or epilepsy (Knuesel et al., 2014). Studies on rodents have shown that viral infections or injections of compounds mimicking the presence of viruses or bacteria viral (mainly the viral mimic polyriboinosinic-polyribocytidilic acid [Poly(I:C)] or the bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS)) during pregnancy induce long term structural and functional changes in the offspring's brain that were caused by the maternal immune response and not by the virus/bacteria/mimetic itself (Boksa, 2010; Knuesel et al., 2014; Meyer, 2014; Meyer et al., 2009a). Critical steps linking the activation of the maternal immune system to the modification of the offspring's brain have been identified. An increase of the level of interleukin IL-6 in the maternal serum is necessary and sufficient to alter the brain development and the behavior in offspring (Smith et al., 2007). In the case of ASD, this elevated level of IL-6 activate maternal blood T helper 17 (Th17) lymphocytes that produces the interleukin IL-17, which then crosses the placenta and reaches the brain to increase the expression of IL-17 (receptors IL-17Ra), thereby favoring IL-17 signaling in the brain (Choi et al., 2016). MIA, however, involves other inflammatory mediators such as CXCL8 (Ellman et al., 2010), TNFα (Cai et al., 2000; Xu et al., 2006), IL-1β (Cai et al., 2000; Rousset et al., 2006) and IL-10 (Meyer et al., 2008) and its consequences on brain development is most likely resulting from the imbalance of several pro- and anti-inflammatory mediators (Knuesel et al., 2014; Meyer et al., 2009b).

How do microglial cells fit into this picture? First, altered phenotypes of microglia have been reported from *post-mortem* analysis of patients and from PET imaging of live patients suffering from diseases related to neurodevelopmental disorders (Frick et al., 2013; Knuesel et al., 2014; van Berckel et al., 2008). Moreover, RNA-sequencing indicates an association between ASD and the expression of genes related to microglia activation (Voineagu et al., 2011). In several animal models of MIA (*e.g.* maternal injection of LPS or Poly(I:C)) microglial phenotype is altered early on and some of these alterations persist on the long term and even until adulthood (Cao et al., 2015; Giovanoli et al., 2013; Juckel et al., 2011; Krstic et al., 2012). It should be mentioned, however, that some experimental evidence argues against the involvement of microglia in linking MIA with impaired neurodevelopment. For instance, recent *in vivo* studies reported no change of microglia phenotype (density, morphology, expression of several markers) after Poly(I:C) injections in pregnant mice (Giovanoli et al., 2016; Smolders et al., 2015). Analysis of microglial mutant mice also provides some evidence, but no definitive proof, for the involvement of CNS resident macrophages in neurodevelopmental disorders. DAP12 is a transmembrane adaptor protein for a family of innate immunoreceptors that, in the healthy CNS, is expressed transiently around birth and only in microglia (Roumier et al., 2004). Mutations of DAP12 in humans induce Nasu-Hakola disease, an early dementia without any apparent neuronal damage (Paloneva et al., 2000). Analysis of a loss-of-function mutant mouse shows that the density of microglia is transiently enhanced at P0, with a marked pro-inflammatory profile, and that adult hippocampal excitatory synapses display an enhanced relative contribution of AMPA receptors and an impaired long-term potentiation (Roumier et al., 2004). Interestingly, a similar phenotype is found in the offspring of wildtype mice after LPS-induced MIA (Roumier et al., 2008). The fractalkine receptor CX3CR1, which is only expressed by microglia in the brain (see Section 2), is down-regulated in schizophrenia patients (Bergon et al., 2015) and CX3CR1 deficiency in adult mice is associated with impaired functional long-range connectivity, social behavior together with increased repetitive-behavior phenotypes (Zhan et al., 2014). However, it is not clear whether this phenotype reminiscent of neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders is the consequence of microglia dysfunctions during development (see Section 5) (Hoshiko et al., 2012; Paolicelli et al., 2011; Squarzoni et al., 2014) or of the constitutive upregulation of IL-1β signaling responsible for memory deficits and impaired LTP of in these mutant mice (Rogers et al., 2011). It should also be pointed out that the consequences of CX3CR1 deficiency on synaptic plasticity and memory remains controversial (Maggi et al., 2011). Another controversial issue concerns the role of microglia in Rett syndrome, a severe neurodevelopmental disorder with autistic phenotypes resulting from mutations of the *MeCP2* gene located on the X chromosome. The *MeCP2* null mouse is used as an animal model of the disease and microglial cells had been initially proposed to play a major role in the disease progression. Transplanting wild-type bone marrow cells carrying *MeCP2* gene after irradiation and before phenotypic onset greatly rescued the phenotype of null mutant mice (Derecki et al., 2012). Although the same group recently confirmed these findings (Cronk et al., 2015), others reported almost no effect of re-introducing wild-type myeloid cells in three different mouse models of the Rett syndrome (Wang et al., 2015). Yet, a recent report showed that

microglia of *MeCP2* mutant mice excessively eliminate synapses by engulfing presynaptic axon terminals at late stages of the disease. Unexpectedly, loss or gain of *MeCP2* expression in microglia had little effect on this excessive synaptic pruning (Schafer et al., 2016). Thus, microglial cells may not be responsible or even involved in the initial steps of this disorder, but they probably contribute to late stages of the disease and fractalkine/CX3CR1 signaling may control some of their actions (Horiuchi et al., 2016).

These observations are consistent with microglial cells being involved in neurodevelopmental pathologies but it remains unclear whether impaired microglia-neuron interactions during development are the triggering event that will impact on the long term the functions of synaptic networks in these diseases. Based on our knowledge of microglia properties during development and in pathological conditions, several non-exclusive mechanisms could explain a long lasting effect of an early dysfunction of microglia-neuron interactions during development. First, the early immune challenge or insult induces an acute activation of microglial cells that impact neural and synaptic development by an excessive release of pro-inflammatory mediators and the induction of cell death. This would lead to the building up of an abnormal network in an irreversible manner. This may be a possible scenario under severe conditions of MIA or in diffuse white matter injury induced in preterm infants and in which pro-inflammatory action of microglia could prevent proper maturation of oligodendrocytes (van Tilborg et al., 2016). Second, a less severe recruitment of microglia with less deleterious consequences on neuronal survival may nevertheless prevent microglial cells from performing properly their physiological functions. This scenario may lead to long lasting effects if it occurs during critical periods of development that determine long lasting properties of neuronal networks. This may explain why MIA is a risk factor for a large array of pathologies (see above and (Knuesel et al., 2014)): preventing microglia from controlling dopaminergic axon growth during embryonic development (Squarzoni et al., 2014) will have different consequences than preventing an efficient pruning of retino-thalamic synapse at early postnatal stages (Schafer et al., 2012). Interestingly, ASD has been proposed to be a "critical period" disorder (Fagiolini and Leblanc, 2011). Last, the initial insult primes microglia and the consequences of this priming will be revealed only by a second hit, which will trigger a stronger response than on naïve non-primed microglia (Fig. 1C). Experimental evidence indicates that, beside gene transcription, epigenetic modifications also determine microglial behavior (Garden, 2013). Epigenetic changes induced during development by the first hit could set a specific long-term transcriptional profile of microglia, leading otherwise silent mutations or benign environmental disturbances to deleterious CNS conditions. In this scenario, timing of the initial insult may not be the critical parameter and the variety of possible outcomes would be determined by the nature of the second hit.

6. Conclusions and perspectives

The discovery of microglial cells regulating synapses in physiological conditions has changed our view on the importance of these cells in CNS physiology and has motivated a large number of studies during the last decade. Considering the capability of these immune cells to remodel their phenotype according to environmental cues, they can certainly be considered as the most plastic cell type of the CNS. However, our knowledge of how neurons and other glial cells communicate with microglia is still sparse. One limitation that has precluded the analysis of other cells-to-microglia communication pathways has been the difficulty to label microglia *in situ* with calcium dyes (or other fluorescent dyes reporting on the activity of intracellular second messenger pathways). Evidence provided by *in vitro* analyses suggests that specific microglial functions are coupled to intracellular calcium signaling but there is so far only few studies on this signaling pathway *in situ* or *in vivo* (Brawek and Garaschuk, 2013). The development of new animal models allowing the use of genetically encoded calcium reporters expressed specifically in microglia (Pozner et al., 2015) will certainly help to overcome the technical limitations mentioned above and should allow the analysis of calcium signaling in microglia in various physiological and pathological contexts. This will be particularly important in the developing CNS where microglial cells are exposed to a lot of different cues, with a variety of spatio-temporal profiles, for which live imaging of calcium dynamics in microglia will help identifying the signaling pathways controlling the various functions of these cells.

A second important step forward is the single-cell analysis of transcriptomics and epigenomics at specific stages of the development. Microglia development is governed by a stepwise program specifying their global phenotype at early embryonic, perinatal and adult stages (Matcovitch-Natan et al., 2016). Yet, besides this general program, local cues determine finer features that eventually lead to regional heterogeneity of adult microglia (Grabert et al., 2016; Hart et al., 2012; Ribeiro Xavier et al., 2015; Schnell et al., 1999). During development, maturation stages of the different CNS areas will determine the local cues that will influence the phenotype of microglia (Fig. 1B). Since CNS areas have specific temporal patterns of maturation, different microglia phenotypes co-exist at any given stage of development. Even within a given area, different microglial phenotypes can be observed at a given stage (see above Section 5). Whether these different transient phenotypes correspond to different steps of a unique program or to acute responses to the appearance of different transient signals is not yet clear. Moreover, how these transient specific developmental phenotypes will determine long-term features of microglia need also to be evaluated, in particular in the case of an immune challenge occurring during development. The identification of the different transcriptomes expressed by microglia at specific location and at specific times during normal and pathological development will allow elucidating the actual role of microglia in developmental disorders.

As many other fields of neuroscience, sex differences in microglia functions have been ignored for long time. There is, however, evidence for sex difference in microglia CNS colonization during development (see above section 6) and in animal models of CNS disorders such as neuropathic pain (Sorge et al., 2015), chronic anxiety (Caetano et al., 2016) and stroke in aged animals (McCullough et al., 2016). Interestingly, in the latter case, the origin of this difference appears to rely on sex chromosome complement and not on hormone levels. In the context of development, this opens the possibility that sex differences in neurodevelopmental disorders, even those relying on perturbations occurring before the production of sexual hormones, involves genes on the Y chromosome that determine microglial responses.

Besides genetics, microglia phenotype during development is also highly dependent on environment and one of the most striking examples is probably the influence of microbiota on microglia maturation. Accumulating evidence indicates that the gut-brain axis and its modulation by microbiota are key parameters of CNS development and disorders, including ASD and schizophrenia (Dinan and Cryan, 2016; Erny et al., 2017). Recently, Erny and collaborators showed that the maturation of microglia (morphology, gene expression and innate immune responses) is altered in germ-free mice and that host microbiota controls microglia phenotype throughout life (Erny et al., 2015). The signaling pathways involved in these interactions remains largely unknown but it is certainly worth investigating whether

abnormal development of microglia following early dysfunctions of the gut-brain axis is involved in neurodevelopmental disorders.

Finally, another aspect of microglial cell research that will be exciting to follow in a near future is the study of their relationships with astrocytes in the context of synapse development. By promoting synaptogenesis, contributing to synapse elimination and modulating synaptic maturation and functions, astrocytes have emerged as important player of neural circuit development (Clarke and Barres, 2013). Whether astrocytes contribute to microglia recruitment at developing synapses and how the two types of glial cells cooperate to eliminate synapses and control their maturation and functions remains to be elucidated. Considering their different origin, astrocytes and microglia are likely to play different roles but it is surprising to see how much they contribute to similar aspects of synapse development and could both potentially impact neurodevelopmental disorders (Chung et al., 2015).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The Audinat lab is supported by grants from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM: DEQ20140329488), the European Union (ERA-NET Neuron BrIE), the Université Sorbonne Paris Cité (RIPPTSA) and is affiliated to Paris School of Neuroscience (ENP).

References

Šišková, Z., Tremblay, M.-È., 2013. Microglia and synapse: interactions in health and neurodegeneration. Neural Plast. 2013, 425845. doi:http://dx.doi.org/10.1155/2013/425845.
Allendoerfer, K.L., Shatz, C.J., 1994. The subplate, a transient neocortical structure: its role in the development of connections between thalamus and cortex. Annu. Rev. Neurosci. 17, 185–218. doi:http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ne.17.030194.001153.
Alliot, F., Lecain, E., Grima, B., Pessac, B., 1991. Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88, 1541–1545.
Amateau, S.K., McCarthy, M.M., 2004. Induction of PGE2 by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior. Nat. Neurosci. 7, 643–650. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nn1254.
Antony, J.M., Paquin, A., Nutt, S.L., Kaplan, D.R., Miller, F.D., 2011. Endogenous microglia regulate development of embryonic cortical precursor cells. J. Neurosci. Res. 89, 286–298. doi:http://dx.doi.org/10.1002/jnr.22533.
Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H., Robitaille, R., Volterra, A., 2014. Gliotransmitters travel in time and space. Neuron 81, 728–739. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.007.
Arno, B., Grassivaro, F., Rossi, C., Bergamaschi, A., Castiglioni, V., Furlan, R., Greter, M., Favaro, R., Comi, G., Becher, B., Martino, G., Muzio, L., 2014. Neural progenitor cells orchestrate microglia migration and positioning into the developing cortex. Nat. Commun. 5, 5611.
Arnoux, I., Audinat, E., 2015. Fractalkine signaling and microglia functions in the developing brain. Neural Plast. 80, 43–56. doi:http://dx.doi.org/10.1155/2015/689404.
Arnoux, I., Hoshiko, M., Mandavy, L., Avignone, E., Yamamoto, N., Audinat, E., 2013. Adaptive phenotype of microglial cells during the normal postnatal development of the somatosensory Barrel cortex. Glia 61, 1582–1594.
Arnoux, I., Hoshiko, M., Sanz, D.A., Audinat, E., 2014. Paradoxical effects of minocycline in the developing mouse somatosensory cortex. Glia 62, 399–410.
Ashwell, K., 1989. Development of microglia in the albino rabbit retina. J. Comp. Neurol. 287, 286–301.
Ashwell, K., 1990. Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. Brain Res. Dev. Brain Res. 55, 219–230.
Askew, K., Li, K., Olmos-Alonso, A., Garcia-Moreno, F., Liang, Y., Richardson, P., Tipton, T., Chapman, M.A., Riecken, K., Beccari, S., Sierra, A., Molnár, Z., Cragg, M. S., Garaschuk, O., Perry, V.H., Gomez-Nicola, D., 2017. Coupled proliferation and apoptosis maintain the rapid turnover of microglia in the adult brain. Cell Rep. 18, 391–405. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.041.
Avignone, E., Ulmann, L., Levavasseur, F., Rassendren, F., Audinat, E., 2008. Status epilepticus induces a particular microglial activation state characterized by enhanced purinergic signaling. J. Neurosci. 28, 9133–9144.
Beattie, E.C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J.C., Ha, B.K., Von Zastrow, M., Beattie, M.S., Malenka, R.C., 2002. Control of synaptic strength by glial TNFalpha. Science (80-.) 295, 2282–2285. doi:http://dx.doi.org/10.1126/science.1067859.
Bechade, C., Cantaut-Belarif, Y., Bessis, A., 2013. Microglial control of neuronal activity. Front. Cell. Neurosci. 7, 32.
Bergon, A., Belzeaux, R., Comte, M., Pelletier, F., Hervé, M., Gardiner, E.J., Beveridge, N.J., Liu, B., Carr, V., Scott, R.J., Kelly, B., Cairns, M.J., Kumarasinghe, N., Schall, U., Blin, O., Boucraut, J., Tooney, P.A., Fakra, E., Ibrahim, E.C., 2015. CX3CR1 is dysregulated in blood and brain from schizophrenia patients. Schizophr. Res. 168, 434–443. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2015.08.010.
Bertrand, J.Y., Jalil, A., Klaine, M., Jung, S., Cumano, A., Godin, I., 2005. Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. Blood 106, 3004–3011.
Bezzi, P., Domercq, M., Brambilla, L., Galli, R., Schols, D., De Clercq, E., Vescovi, A., Bagetta, G., Kollias, G., Meldolesi, J., Volterra, A., 2001. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. Nat. Neurosci. 4, 702–710.
Bialas, A.R., Stevens, B., 2013. Supplemental_TGF-β signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement. Nat. Neurosci. 16, 1773–1782. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nn.3560.
Biber, K., Neumann, H., Inoue, K., Boddeke, H.W., 2007. Neuronal on and off signals control microglia. Trends Neurosci. 30, 596–602.
Blinzinger, K., Kreutzberg, G., 1968. Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 85, 145–157.
Boche, D., Perry, V.H., Nicoll, J.A., 2013. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 39, 3–18.
Boksa, P., 2010. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. Brain Behav. Immun. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2010.03.005.
Boucsein, C., Kettenmann, H., Nolte, C., 2000. Electrophysiological properties of microglial cells in normal and pathologic rat brain slices. Eur. J. Neurosci. 12, 2049–2058 (ejn100 [pii]).
Brawek, B., Garaschuk, O., 2013. Microglial calcium signaling in the adult, aged and diseased brain. Cell Calcium doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2012.12.003.
Brockhaus, J., Ilschner, S., Banati, R.B., Kettenmann, H., 1993. Membrane properties of ameboid microglial cells in the corpus callosum slice from early postnatal mice. J. Neurosci. 13, 4412–4421.
Brown, G.C., Neher, J.J., 2014. Microglial phagocytosis of live neurons. Nat. Rev. Neurosci. 15, 209–216. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nrn3710.
Butovsky, O., Jedrychowski, M.P., Moore, C.S., Cialic, R., Lanser, A.J., Gabriely, G., Koeglsperger, T., Dake, B., Wu, P.M., Doykan, C.E., Fanek, Z., Liu, L., Chen, Z., Rothstein, J.D., Ransohoff, R.M., Gygi, S.P., Antel, J.P., Weiner, H.L., 2014. Identification of a unique TGF-β-dependent molecular and functional signature in microglia. Nat. Neurosci. 17, 131–143. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nn.3599.
Caetano, L., Pinheiro, H., Patrício, P., Mateus-Pinheiro, A., Alves, N.D., Coimbra, B., Baptista, F.I., Henriques, S.N., Cunha, C., Santos, A.R., Ferreira, S.G., Sardinha, V. M., Oliveira, J.F., Ambrósio, A.F., Sousa, N., Cunha, R.A., Rodrigues, A.J., Pinto, L., Gomes, C.A., 2016. Adenosine A2A receptor regulation of microglia morphological remodeling-gender bias in physiology and in a model of chronic anxiety. Mol. Psychiatry doi:http://dx.doi.org/10.1038/mp.2016.173.
Cai, Z., Pan, Z.L., Pang, Y., Evans, O.B., Rhodes, P.G., 2000. Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. Pediatr. Res. 47, 64–72. doi:http://dx.doi.org/10.1203/00006450-200001000-00013.
Caldero, J., Brunet, N., Ciutat, D., Hereu, M., Esquerda, J.E., 2009. Development of microglia in the chick embryo spinal cord: implications in the regulation of motoneuronal survival and death. J. Neurosci. Res. 87, 2447–2466.
Cao, M., Cortes, M., Moore, C.S., Leong, S.Y., Durosier, L.D., Burns, P., Fecteau, G., Desrochers, A., Auer, R.N., Barreiro, L.B., Antel, J.P., Frasch, M.G., 2015. Fetal microglial phenotype in vitro carries memory of prior in vivo exposure to inflammation. Front Cell Neurosci. 9, 294. doi:http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2015.00294.
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., Lee, J.C., Cook, D.N., Jung, S., Lira, S. A., Littman, D.R., Ransohoff, R.M., 2006. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. Nat. Neurosci. 9, 917–924.
Cardona, A.E., Li, M., Liu, L., Savarin, C., Ransohoff, R.M., 2008. Chemokines in and out of the central nervous system: much more than chemotaxis and inflammation. J. Leukoc. Biol. 84, 587–594.
Chamak, B., Morandi, V., Mallat, M., 1994. Brain macrophages stimulate neurite growth and regeneration by secreting thrombospondin. J. Neurosci. Res. 38, 221–233.
Chamak, B., Dobbertin, A., Mallat, M., 1995. Immunohistochemical detection of thrombospondin in microglia in the developing rat brain. Neuroscience 69, 177–187.
Chen, S.-H., Oyarzabal, E.A., Hong, J.-S., 2016. Critical role of the Mac1/NOX2 pathway in mediating reactive microgliosis-generated chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. Curr. Opin. Pharmacol. 26, 54–60. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2015.10.001.
Cho, S.H., Sun, B., Zhou, Y., Kauppinen, T.M., Halabisky, B., Wes, P., Ransohoff, R.M., Gan, L., 2011. CX3CR1 protein signaling modulates microglial activation and protects against plaque-independent cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer disease. J. Biol. Chem. 286, 32713–32722.

Choi, G.B., Yim, Y.S., Wong, H., Kim, S., Kim, H., Kim, S.V., Hoeffer, C.A., Littman, D.R., Huh, J.R., 2016. The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. Science (80-). 351, 933–939.
Christopherson, K.S., Ullian, E.M., Stokes, C.C.A., Mullowney, C.E., Hell, J.W., Agah, A., Lawler, J., Mosher, D.F., Bornstein, P., Barres, B.A., 2005. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. Cell 120, 421–433. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.020.
Chung, W.-S., Clarke, L.E., Wang, G.X., Stafford, B.K., Sher, A., Chakraborty, C., Joung, J., Foo, L.C., Thompson, A., Chen, C., Smith, S.J., Barres, B.A., 2013. Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. Nature 504, 394–400. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nature12776.
Chung, W.-S., Welsh, C.A., Barres, B.A., Stevens, B., 2015. Do glia drive synaptic and cognitive impairment in disease? Nat. Neurosci. 18, 1539–1545. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nn.4142.
Clark, A.K., Gruber-Schoffnegger, D., Drdla-Schutting, R., Gerhold, K.J., Malcangio, M., Sandkühler, J., 2015. Selective activation of microglia facilitates synaptic strength. J. Neurosci. 35, 4552–4570. doi:http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2061-14.2015.
Clarke, L.E., Barres, B.A., 2013. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. Nat. Rev. Neurosci. 14, 311–321. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nrn3484.
Cronk, J.C., Derecki, N.C., Ji, E., Xu, Y., Lampano, A.E., Smirnov, I., Baker, W., Norris, G. T., Marin, I., Coddington, N., Wolf, Y., Turner, S.D., Aderem, A., Klibanov, A.L., Harris, T.H., Jung, S., Litvak, V., Kipnis, J., 2015. Methyl-CpG binding protein 2 regulates microglia and macrophage gene expression in response to inflammatory stimuli. Immunity 42, 679–691. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2015.03.013.
Cuadros, M.A., Navascues, J., 2001. Early origin and colonization of the developing central nervous system by microglial precursors. Prog. Brain Res. 132, 51–59.
Cuadros, M.A., Rodriguez-Ruiz, J., Calvente, R., Almendros, A., Marin-Teva, J.L., Navascues, J., 1997. Microglia development in the quail cerebellum. J. Comp. Neurol. 389, 390–401.
Cunningham, C.L., Martinez-Cerdeno, V., Noctor, S.C., 2013. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. J. Neurosci. 33, 4216–4233.
Dalmau, I., Finsen, B., Zimmer, J., Gonzalez, B., Castellano, B., 1998. Development of microglia in the postnatal rat hippocampus. Hippocampus 8, 458–474.
Dalmau, I., Vela, J.M., Gonzalez, B., Finsen, B., Castellano, B., 2003. Dynamics of microglia in the developing rat brain. J. Comp. Neurol. 458, 144–157.
Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., Gan, W.B., 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. Nat. Neurosci. 8, 752–758.
De Groot, C.J., Huppes, W., Sminia, T., Kraal, G., Dijkstra, C.D., 1992. Determination of the origin and nature of brain macrophages and microglial cells in mouse central nervous system, using non-radioactive in situ hybridization and immunoperoxidase techniques. Glia 6, 301–309.
Degos, V., Favrais, G., Kaindl, A.M., Peineau, S., Guerrot, A.M., Verney, C., Gressens, P., 2010. Inflammation processes in perinatal brain damage. J. Neural. Transm. 117, 1009–1017.
Derecki, N.C., Cronk, J.C., Lu, Z., Xu, E., Abbott, S.B.G., Guyenet, P.G., Kipnis, J., 2012. Wild-type microglia arrest pathology in a mouse model of Rett syndrome. Nature 484, 105–109. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nature10907.
Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2016. Gut Instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. J. Physiol. doi:http://dx.doi.org/10.1113/jp273106.
Earle, K.L., Mitrofanis, J., 1998. Development of glia and blood vessels in the internal capsule of rats. J. Neurocytol. 27, 127–139.
Ekdahl, C.T., 2012. Microglial activation — tuning and pruning adult neurogenesis. Front. Pharmacol. 3, 41.
Elliott, M.R., Chekeni, F.B., Trampont, P.C., Lazarowski, E.R., Kadl, A., Walk, S.F., Park, D., Woodson, R.I., Ostankovich, M., Sharma, P., Lysiak, J.J., Harden, T.K., Leitinger, N., Ravichandran, K.S., 2009. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. Nature 461, 282–286. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nature08296.
Ellman, L.M., Deicken, R.F., Vinogradov, S., Kremen, W.S., Poole, J.H., Kern, D.M., Tsai, W.Y., Schaefer, C.A., Brown, A.S., 2010. Structural brain alterations in schizophrenia following fetal exposure to the inflammatory cytokine interleukin-8. Schizophr. Res. 121, 46–54. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2010.05.014.
Elmore, M.R., Najafi, A.R., Koike, M.A., Dagher, N.N., Spangenberg, E.E., Rice, R.A., Kitazawa, M., Matusow, B., Nguyen, H., West, B.L., Green, K.N., 2014. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. Neuron 82, 380–397.
Erblich, B., Zhu, L., Etgen, A.M., Dobrenis, K., Pollard, J.W., 2011. Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. PLoS One 6, e26317.
Erny, D., Hrabe de Angelis, A.L., Jaitin, D., Wieghofer, P., Staszewski, O., David, E., Keren-Shaul, H., Mahlakoiv, T., Jakobshagen, K., Buch, T., Schwierzeck, V., Utermohlen, O., Chun, E., Garrett, W.S., McCoy, K.D., Diefenbach, A., Staeheli, P., Stecher, B., Amit, I., Prinz, M., 2015. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. Nat. Neurosci. 18, 965–977.
Erny, D., Hrabe de Angelis, A.L., Prinz, M., 2017. Communicating systems in the body: how microbiota and microglia cooperate. Immunology 150, 7–15.
Eyo, U.B., Wu, L.J., 2013. Bidirectional microglia-neuron communication in the healthy brain. Neural Plast. 2013, 456857.
Eyo, U.B., Miner, S.A., Weiner, J.A., Dailey, M.E., 2015. Developmental changes in microglial mobilization are independent of apoptosis in the neonatal mouse hippocampus. Brain Behav. Immun. 55, 49–59.
Fagiolini, M., Leblanc, J.J., 2011. Autism: a critical period disorder? Neural Plast. doi:http://dx.doi.org/10.1155/2011/921680.
Fedoroff, S., Zhai, R., Novak, J.P., 1997. Microglia and astroglia have a common progenitor cell. J. Neurosci. Res. 50, 477–486.
Frade, J.M., Barde, Y.A., 1998. Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. Neuron 20, 35–41.
Frick, L.R., Williams, K., Pittenger, C., 2013. Microglial dysregulation in psychiatric disease. Clin. Dev. Immunol. doi:http://dx.doi.org/10.1155/2013/608654.
Frost, J.L., Schafer, D.P., 2016. Microglia: architects of the developing nervous system. Trends Cell Biol. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2016.02.006.
Fujita, S., Tsuchihashi, Y., Kitamura, T., 1981. Origin, morphology and function of the microglia. Prog. Clin. Biol. Res. 59A, 141–169.
Garden, G.A., 2013. Epigenetics and the modulation of neuroinflammation. Neurotherapeutics doi:http://dx.doi.org/10.1007/s13311-013-0207-4.
Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., Samokhvalov, I.M., Merad, M., 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. Science (80-.) 330, 841–845.
Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., Huber, T., 2013. Origin and differentiation of microglia. Front. Cell Neurosci. 7, 45.
Ginhoux, F., Schultze, J.L., Murray, P.J., Ochando, J., Biswas, S.K., 2015. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. Nat. Immunol. 17, 34–40. doi:http://dx.doi.org/10.1038/ni.3324.
Giovanoli, S., Engler, H., Engler, A., Richetto, J., Voget, M., Willi, R., Winter, C., Riva, M. A., Mortensen, P.B., Feldon, J., Schedlowski, M., Meyer, U., Brown, A.S., Pedersen, C.B., Mortensen, P.B., Herbert, M.R., Tsuchiya, K.J., Byrne, M., Mortensen, P.B., Green, J.G., Holmes, W.C., Slap, G.B., Brown, A.S., Patterson, P.H., Varese, F., Selten, J.P., Frissen, A., Lensvelt-Mulders, G., Morgan, V.A., Mednick, S.A., Machon, R.A., Huttunen, M.O., Bonett, D., Clarke, M.C., Tanskanen, A., Huttunen, M., Whittaker, J.C., Cannon, M., Bayer, T.A., Falkai, P., Maier, W., Maynard, T.M., Sikich, L., Lieberman, J.A., LaMantia, A.S., Meyer, U., Feldon, J., Fatemi, S.H., Spear, L.P., Fisher, H.L., Paus, T., Keshavan, M., Giedd, J.N., Hsiao, E.Y., McBride, S.W., Chow, J., Mazmanian, S.K., Patterson, P.H., Meyer, U., Feldon, J., Dammann, O., Frank, M.G., Baratta, M.V., Sprunger, D.B., Watkins, L.R., Maier, S.F., Franklin, T.B., Saab, B.J., Mansuy, I.M., Ransohoff, R.M., Perry, V.H., Ransohoff, R.M., Cardona, A. E., Bolton, J.L., Meyer, U., Feldon, J., Schedlowski, M., Yee, B.K., Brown, A.S., Atladóttir, H.O., Spear, L.P., Pruessner, M., Iyer, S.N., Faridi, K., Joober, R., Malla, A. K., Meyer, U., Feldon, J., Meyer, U., Patterson, P.H., Watanabe, Y., Someya, T., Nawa, H., Müller, N., Schwarz, M.J., Livak, K.J., Schmittgen, T.D., Winter, C., Vuillermot, S., Gundersen, H.J., et al., 2013. Stress in puberty unmasks latent neuropathological consequences of prenatal immune activation in mice. Science 339, 1095–1099. doi:http://dx.doi.org/10.1126/science.1228261.
Giovanoli, S., Weber-Stadlbauer, U., Schedlowski, M., Meyer, U., Engler, H., 2016. Prenatal immune activation causes hippocampal synaptic deficits in the absence of overt microglia anomalies. Brain Behav. Immun. 55, 25–38. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2015.09.015.
Goldmann, T., Wieghofer, P., Jordão, M.J.C., Prutek, F., Hagemeyer, N., Frenzel, K., Amann, L., Staszewski, O., Kierdorf, K., Krueger, M., Locatelli, G., Hochgerner, H., Zeiser, R., Epelman, S., Geissmann, F., Priller, J., Rossi, F.M.V., Bechmann, I., Kerschensteiner, M., Linnarsson, S., Jung, S., Prinz, M., 2016. Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. Nat. Immunol. 17, 797–805. doi:http://dx.doi.org/10.1038/ni.3423.
Grabert, K., Michoel, T., Karavolos, M.H., Clohisey, S., Baillie, J.K., Stevens, M.P., Freeman, T.C., Summers, K.M., McColl, B.W., 2016. Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. Nat. Neurosci. 19, 504–516. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nn.4222.
Greter, M., Lelios, I., Pelczar, P., Hoeffel, G., Price, J., Leboeuf, M., Kundig, T.M., Frei, K., Ginhoux, F., Merad, M., Becher, B., 2012. Stroma-derived interleukin-34 controls the development and maintenance of langerhans cells and the maintenance of microglia. Immunity 37, 1050–1060.
Gude, D.R., Alvarez, S.E., Paugh, S.W., Mitra, P., Yu, J., Griffiths, R., Barbour, S.E., Milstien, S., Spiegel, S., 2008. Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a come-and-get-me signal. FASEB J. 22, 2629–2638. doi:http://dx.doi.org/10.1096/fj.08-107169.
Hanamsagar, R., Bilbo, S.D., 2016. Sex differences in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders: focus on microglial function and neuroinflammation during development. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.09.039.
Hanisch, U.K., Kettenmann, H., 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nat. Neurosci. 10, 1387–1394.
Hao, C., Richardson, A., Fedoroff, S., 1991. Macrophage-like cells originate from neuroepithelium in culture: characterization and properties of the macrophage-like cells. Int. J. Dev. Neurosci. 9, 1–14.
Hart, A.D., Wyttenbach, A., Hugh Perry, V., Teeling, J.L., 2012. Age related changes in microglial phenotype vary between CNS regions: grey versus white matter differences. Brain Behav. Immun. 26, 754–765. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2011.11.006.
Haynes, S.E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M.E., Gan, W.B., Julius, D., 2006. The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. Nat. Neurosci. 9, 1512–1519.
Heppner, F.L., Ransohoff, R.M., Becher, B., 2015. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. Nat. Rev. Neurosci. 16, 358–372.

Herbomel, P., Thisse, B., 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.
Hirsch, E., Irikura, V.M., Paul, S.M., Hirsh, D., 1996. Functions of interleukin 1 receptor antagonist in gene knockout and overproducing mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 11008–11013.
Hoeffel, G., Ginhoux, F., 2015. Ontogeny of tissue-resident macrophages. Front. Immunol 6, 486. doi:http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00486.
Hoeppner, D.J., Hengartner, M.O., Schnabel, R., 2001. Engulfment genes cooperate with ced-3 to promote cell death in Caenorhabditis elegans. Nature 412, 202–206. doi:http://dx.doi.org/10.1038/35084103.
Horiuchi, M., Smith, L., Maezawa, I., Jin, L.-W., 2016. CX3CR1 ablation ameliorates motor and respiratory dysfunctions and improves survival of a Rett syndrome mouse model. Brain. Behav. Immun. 60, 106–116 Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889159116300356.
Hoshiko, M., Arnoux, I., Avignone, E., Yamamoto, N., 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. doi:http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1167-12.2012.
Hua, J.Y., Smith, S.J., 2004. Neural activity and the dynamics of central nervous system development. Nat. Neurosci. 7, 327–332.
Hume, D.A., Perry, V.H., Gordon, S., 1983. Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. J. Cell Biol. 97, 253–257.
Imamoto, K., Leblond, C.P., 1978. Radioautographic investigation of gliogenesis in the corpus callosum of young rats. II. Origin of microglial cells. J. Comp. Neurol. 180, 139–163. doi:http://dx.doi.org/10.1002/cne.901800109.
Juckel, G., Manitz, M.P., Brüne, M., Friebe, A., Heneka, M.T., Wolf, R.J., 2011. Microglial activation in a neuroinflammational animal model of schizophrenia — a pilot study. Schizophr. Res. 131, 96–100. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2011.06.018.
Kaur, C., Ling, E.A., Wong, W.C., 1987. Origin and fate of neural macrophages in a stab wound of the brain of the young rat. J. Anat. 154, 215–227.
Kawasaki, Y., Zhang, L., Cheng, J.-K., Ji, R.-R., 2008. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. J. Neurosci. 28, 5189–5194. doi:http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3338-07.2008.
Kettenmann, H., Hanisch, U.K., Noda, M., Verkhratsky, A., 2011. Physiology of microglia. Physiol. Rev. 91, 461–553.
Kettenmann, H., Kirchhoff, F., Verkhratsky, A., 2013. Microglia: new roles for the synaptic stripper. Neuron 77, 10–18.
Kierdorf, K., Prinz, M., 2013. Factors regulating microglia activation. Front. Cell Neurosci. 7, 44.
Kierdorf, K., Erny, D., Goldmann, T., Sander, V., Schulz, C., Perdiguero, E.G., Wieghofer, P., Heinrich, A., Riemke, P., Holscher, C., Muller, D.N., Luckow, B., Brocker, T., Debowski, K., Fritz, G., Opdenakker, G., Diefenbach, A., Biber, K., Heikenwalder, M., Geissmann, F., Rosenbauer, F., Prinz, M., 2013. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. Nat. Neurosci. 16, 273–280.
Knuesel, I., Chicha, L., Britschgi, M., Schobel, S.A., Bodmer, M., Hellings, J.A., Toovey, S., Prinssen, E.P., 2014. Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. Nat. Rev. Neurol. 10, 643–660. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2014.187.
Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, B.V., Jacobson, K.A., Kohsaka, S., Inoue, K., 2007. UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. Nature 446, 1091–1095. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nature05704.
Kolodziejczak, M., Béchade, C., Gervasi, N., Irinopoulou, T., Banas, S.M., Cordier, C., Rebsam, A., Roumier, A., Maroteaux, L., 2015. Serotonin modulates developmental microglia via 5-HT2B receptors: potential implication during synaptic refinement of retinogeniculate projections. ACS Chem. Neurosci. 6, 1219–1230. doi:http://dx.doi.org/10.1021/cn5003489.
Krstic, D., Madhusudan, A., Doehner, J., Vogel, P., Notter, T., Imhof, C., Manalastas, A., Hilfiker, M., Pfister, S., Schwerdel, C., Riether, C., Meyer, U., Knuesel, I., 2012. Systemic immune challenges trigger and drive Alzheimer-like neuropathology in mice. J. Neuroinflamm. 9, 151. doi:http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-9-151.
Lai, A.Y., Todd, K.G., 2006. Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions. Can. J. Physiol. Pharmacol. 84, 49–59. doi:http://dx.doi.org/10.1139/Y05-143.
Lauber, K., Bohn, E., Kr??ber, S.M., Xiao, Y.J., Blumenthal, S.G., Lindemann, R.K., Marini, P., Wiedig, C., Zobywalski, A., Baksh, S., Xu, Y., Autenrieth, I.B., Schulze-Osthoff, K., Belka, C., Stuhler, G., Wesselborg, S., 2003. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. Cell 113, 717–730. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00422-7.
Lee, H., Brott, B.K., Kirkby, L.A., Adelson, J.D., Cheng, S., Feller, M.B., Datwani, A., Shatz, C.J., 2014. Synapse elimination and learning rules co-regulated by MHC class I H2-Db. Nature 509, 195–200. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nature13154.
Lelli, A., Gervais, A., Colin, C., Cheret, C., Ruiz de, A.C., Carmeliet, P., Krause, K.H., Boillee, S., Mallat, M., Chéret, C., de Almodovar, C.R., Carmeliet, P., Krause, K.H., Boillée, S., Mallat, M., 2013. The NADPH oxidase Nox2 regulates VEGFR1/CSF-1R-mediated microglial chemotaxis and promotes early postnatal infiltration of phagocytes in the subventricular zone of the mouse cerebral cortex. Glia 61, 1542–1555. doi:http://dx.doi.org/10.1002/glia.22540.
Lenz, K.M., Wright, C.L., Martin, R.C., McCarthy, M.M., 2011. Prostaglandin E_2 regulates AMPA receptor phosphorylation and promotes membrane insertion in preoptic area neurons and glia during sexual differentiation. PLoS One 6, e18500. doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018500.
Lenz, K.M., Nugent, B.M., Haliyur, R., McCarthy, M.M., 2013. Microglia are essential to masculinization of brain and behavior. J. Neurosci. 33, 2761–2772.
Lewitus, G.M., Konefal, S.C., Greenhalgh, A.D., Pribiag, H., Augereau, K., Stellwagen, D., 2016. Microglial TNF-a suppresses cocaine-Induced plasticity and behavioral sensitization. Neuron 90, 483–491. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.030.
Li, Y., Du, X.F., Liu, C.S., Wen, Z.L., Du, J.L., 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., Wong, W.T., 2009. Regulation of dynamic behavior of retinal microglia by CX3CR1 signaling. Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 50, 4444–4451.
Lim, S.H., Park, E., You, B., Jung, Y., Park, A.R., Park, S.G., Lee, J.R., 2013. Neuronal synapse formation induced by microglia and interleukin 10. PLoS One 8 doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0081218.
Ling, E.A., 1994. Monocytic origin of ramified microglia in the corpus callosum in postnatal rat. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 20, 182–183.
Maggi, L., Scianni, M., Branchi, I., D'Andrea, I., Lauro, C., Limatola, C., 2011. CX(3)CR1 deficiency alters hippocampal-dependent plasticity phenomena blunting the effects of enriched environment. Front. Cell Neurosci. 5, 22. doi:http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2011.00022.
Marin-Teva, J.L., Almendros, A., Calvente, R., Cuadros, M.A., Navascues, J., 1998. Tangential migration of ameboid microglia in the developing quail retina: mechanism of migration and migratory behavior. Glia 22, 31–52.
Marin-Teva, J.L., Almendros, A., Calvente, R., Cuadros, M.A., Navascues, J., 1999a. Proliferation of actively migrating ameboid microglia in the developing quail retina. Anat. Embryol. (Berl.) 200, 289–300.
Marin-Teva, J.L., Cuadros, M.A., Calvente, R., Almendros, A., Navascues, J., 1999b. Naturally occurring cell death and migration of microglial precursors in the quail retina during normal development. J. Comp. Neurol. 412, 255–275.
Marin-Teva, J.L., Dusart, I., Colin, C., Gervais, A., van, R.N., Mallat, M., 2004. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. Neuron 41, 535–547.
Martinez, F.O., Gordon, S., 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. F1000Prime. Rep. 6, 13.
Matcovitch-Natan, O., Winter, D.R., Giladi, A., Vargas Aguilar, S., Spinrad, A., Sarrazin, S., Ben-Yehuda, H., David, E., Zelada Gonzalez, F., Perrin, P., Keren-Shaul, H., Gury, M., Lara-Astaiso, D., Thaiss, C.A., Cohen, M., Bahar Halpern, K., Baruch, K., Deczkowska, A., Lorenzo-Vivas, E., Itzkovitz, S., Elinav, E., Sieweke, M.H., Schwartz, M., Amit, I., 2016. Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. Science (80-.) 353, aad8670. doi:http://dx.doi.org/10.1126/science.aad8670.
McCarthy, M.M., Pickett, L.A., VanRyzin, J.W., Kight, K.E., 2015. Surprising origins of sex differences in the brain. Horm. Behav. 76, 3–10. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.04.013.
McCullough, L.D., Mirza, M.A., Xu, Y., Bentivegna, K., Steffens, E.B., Ritzel, R., Liu, F., 2016. Stroke sensitivity in the aged: sex chromosome complement vs. gonadal hormones. Aging (Albany, NY) 8, 1432–1441. doi:http://dx.doi.org/10.18632/aging.100997.
Menteyne, A., Levavasseur, F., Audinat, E., Avignone, E., 2009. Predominant functional expression of Kv1.3 by activated microglia of the hippocampus after status epilepticus. PLoS One 4.
Meyer, U., Murray, P.J., Urwyler, a, Yee, B.K., Schedlowski, M., Feldon, J., 2008. Adult behavioral and pharmacological dysfunctions following disruption of the fetal brain balance between pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory signaling. Mol. Psychiatry 13, 208–221. doi:http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4002042.
Meyer, U., Feldon, J., Fatemi, S.H., 2009a. In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. Neurosci. Biobehav. Rev. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.05.001.
Meyer, U., Feldon, J., Yee, B.K., 2009b. A review of the fetal brain cytokine imbalance hypothesis of schizophrenia. Schizophr. Bull. doi:http://dx.doi.org/10.1093/schbul/sbn022.
Meyer, U., 2014. Prenatal Poly(I:C) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems. Biol. Psychiatry doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.07.011.
Minten, C., Terry, R., Deffrasnes, C., King, N.J.C., Campbell, I.L., 2012. IFN regulatory factor 8 is a key constitutive determinant of the morphological and molecular properties of microglia in the CNS. PLoS One 7, e49851. doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0049851.
Miyamoto, A., Wake, H., Ishikawa, A.W., Eto, K., Shibata, K., Murakoshi, H., Koizumi, S., Moorhouse, A.J., Yoshimura, Y., Nabekura, J., 2016. Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. Nat. Commun. 7, 12540. doi:http://dx.doi.org/10.1038/ncomms12540.
Monier, A., Evrard, P., Gressens, P., Verney, C., 2006. Distribution and differentiation of microglia in the human encephalon during the first two trimesters of gestation. J. Comp. Neurol. 499, 565–582.
Monier, A., dle-Biassette, H., Delezoide, A.L., Evrard, P., Gressens, P., Verney, C., 2007. Entry and distribution of microglial cells in human embryonic and fetal cerebral cortex. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 66, 372–382.
Morgan, S.C., Taylor, D.L., Pocock, J.M., 2004. Microglia release activators of neuronal proliferation mediated by activation of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and delta-Notch signalling cascades. J.

Neurochem. 90, 89–101. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02461.x.
Morganti, J.M., Nash, K.R., Grimmig, B.A., Ranjit, S., Small, B., Bickford, P.C., Gemma, C., 2012. The soluble isoform of CX3CL1 is necessary for neuroprotection in a mouse model of Parkinson's disease. J. Neurosci. 32, 14592–14601.
Moujahid, A., Navascués, J., Marín-Teva, J.L., Cuadros, M.A., 1996. Macrophages during avian optic nerve development: relationship to cell death and differentiation into microglia. Anat. Embryol. (Berl). 193, 131–144.
Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F. O., Mege, J.L., Mosser, D.M., Natoli, G., Saeij, J.P., Schultze, J.L., Shirey, K.A., Sica, A., Suttles, J., Udalova, I., van Ginderachter, J.A., Vogel, S.N., Wynn, T.A., 2014. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. Immunity 41, 14–20.
Nagata, K., Nakajima, K., Kohsaka, S., 1993a. Plasminogen promotes the development of rat mesencephalic dopaminergic neurons in vitro. Brain Res. Dev. Brain Res. 75, 31–37.
Nagata, K., Takei, N., Nakajima, K., Saito, H., Kohsaka, S., 1993b. Microglial conditioned medium promotes survival and development of cultured mesencephalic neurons from embryonic rat brain. J. Neurosci. Res. 34, 357–363. doi:http://dx.doi.org/10.1002/jnr.490340313.
Navascues, J., Calvente, R., Marin-Teva, J.L., Cuadros, M.A., 2000. Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system. An. Acad. Bras. Cienc. 72, 91–102.
Nayak, D., Roth, T.L., McGavern, D.B., 2014. Microglia development and function. Annu. Rev. Immunol. 32, 367–402.
Nikodemova, M., Kimyon, R.S., De, I., Small, A.L., Collier, L.S., Watters, J.J., 2015. Microglial numbers attain adult levels after undergoing a rapid decrease in cell number in the third postnatal week. J. Neuroimmunol. 278, 280–288.
Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F., 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science (80-.) 308, 1314–1318.
Ohsawa, K., Irino, Y., Nakamura, Y., Akazawa, C., Inoue, K., Kohsaka, S., 2007. Involvement of P2 × 4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. Glia 55, 604–616.
Oppenheim, R.W., 1991. Cell death during development of the nervous system. Annu. Rev. Neurosci. 14, 453–501.
Orr, A.G., Orr, A.L., Li, X.J., Gross, R.E., Traynelis, S.F., 2009. Adenosine A(2A) receptor mediates microglial process retraction. Nat. Neurosci. 12, 872–878.
Pagani, F., Paolicelli, R.C., Murana, E., Cortese, B., Di Angelantonio, S., Zurolo, E., Guiducci, E., Ferreira, T.A., Garofalo, S., Catalano, M., D'Alessandro, G., Porzia, A., Peruzzi, G., Mainiero, F., Limatola, C., Gross, C.T., Ragozzino, D., 2015. Defective microglial development in the hippocampus of Cx3cr1 deficient mice. Front. Cell Neurosci. 9, 111. doi:http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2015.00111.
Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C., Keller, G., 1999. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. Development 126, 5073–5084.
Paloneva, J., Kestilä, M., Wu, J., Salminen, A., Böhling, T., Ruotsalainen, V., Hakola, P., Bakker, A.B., Phillips, J.H., Pekkarinen, P., Lanier, L.L., Timonen, T., Peltonen, L., 2000. Loss-of-function mutations in TYROBP (DAP12) result in a presenile dementia with bone cysts. Nat. Genet. 25, 357–361. doi:http://dx.doi.org/10.1038/77153.
Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., Gross, C.T., 2011. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. Science (80-.) 333, 1456–1458.
Paolicelli, R.C., Bisht, K., Tremblay, M.E., 2014. Fractalkine regulation of microglial physiology and consequences on the brain and behavior. Front. Cell Neurosci. 8, 129.
Parkhurst, C.N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J.N., Yates III, J.R., Lafaille, J.J., Hempstead, B. L., Littman, D.R., Gan, W.B., 2013. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. Cell 155, 1596–1609.
Pascual, O., Ben Achour, S., Rostaing, P., Triller, A., Bessis, A., 2012. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. Proc. Natl. Acad. Sci. 109, E197–E205. doi:http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1111098109.
Perry, V.H., Hume, D.A., Gordon, S., 1985. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. Neuroscience 15, 313–326.
Pfeiffer, T., Avignone, E., Nägerl, U.V., 2016. Induction of hippocampal long-term potentiation increases the morphological dynamics of microglial processes and prolongs their contacts with dendritic spines. Sci. Rep. 6, 32422. doi:http://dx.doi.org/10.1038/srep32422.
Pollard, J.W., 2009. Trophic macrophages in development and disease. Nat. Rev. Immunol. 9, 259–270.
Pont-Lezica, L., Bechade, C., Belarif-Cantaut, Y., Pascual, O., 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., Bessis, A., 2014. Microglia shape corpus callosum axon tract fasciculation: functional impact of prenatal inflammation. Eur. J. Neurosci. 39, 1551–1557. doi:http://dx.doi.org/10.1111/ejn.12508.
Poon, V.Y., Choi, S., Park, M., 2013. Growth factors in synaptic function. Front. Synaptic Neurosci. doi:http://dx.doi.org/10.3389/fnsyn.2013.00006.
Pozner, A., Xu, B., Palumbos, S., Gee, J.M., Tvrdik, P., Capecchi, M.R., 2015. Intracellular calcium dynamics in cortical microglia responding to focal laser injury in the PC:G5-tdT reporter mouse. Front. Mol. Neurosci. 8, 1–10. doi:http://dx.doi.org/10.3389/fnmol.2015.00012.
Prinz, M., Priller, J., 2014. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. Nat. Rev. Neurosci. 15, 300–312.
Rachal Pugh, C., Fleshner, M., Watkins, L.R., Maier, S.F., Rudy, J.W., 2001. The immune system and memory consolidation: a role for the cytokine IL-1beta. Neurosci. Biobehav. Rev. 25, 29–41.
Rakic, S., Zecevic, N., 2000. Programmed cell death in the developing human telencephalon. Eur. J. Neurosci. 12, 2721–2734.
Ransohoff, R.M., Perry, V.H., 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. Annu. Rev. Immunol. 27, 119–145. doi:http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132528.
Ransohoff, R.M., 2016. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? Nat. Neurosci. 19, 987–991. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nn.4338.
Reddien, P.W., Cameron, S., Horvitz, H.R., 2001. Phagocytosis promotes programmed cell death in C. elegans. Nature 412, 198–202. doi:http://dx.doi.org/10.1038/35084096.
Rezaie, P., Trillo-Pazos, G., Greenwood, J., Everall, I.P., Male, D.K., 2002. Motility and ramification of human fetal microglia in culture: an investigation using time-lapse video microscopy and image analysis. Exp. Cell Res. 274, 68–82.
Ribeiro Xavier, A.L., Kress, B.T., Goldman, S.A., Lacerda de Menezes, J.R., Nedergaard, M., 2015. A distinct population of microglia supports adult neurogenesis in the subventricular zone. J. Neurosci. 35, 11848–11861. doi:http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1217-15.2015.
Rigato, C., Buckinx, R., Le-Corronc, H., Rigo, J.M., Legendre, P., 2011. Pattern of invasion of the embryonic mouse spinal cord by microglial cells at the time of the onset of functional neuronal networks. Glia 59, 675–695.
Rigato, C., Swinnen, N., Buckinx, R., Couillin, I., Mangin, J.M., Rigo, J.M., Legendre, P., Le, C.H., 2012. Microglia proliferation is controlled by P2 × 7 receptors in a pannexin-1-Independent manner during early embryonic spinal cord invasion. J. Neurosci. 32, 11559–11573.
Rodrigues, R.J., Tome, A.R., Cunha, R.A., 2015. ATP as a multi-target danger signal in the brain. Front. Neurosci. 9, 148.
Rogers, J.T., Morganti, J.M., Bachstetter, A.D., Hudson, C.E., Peters, M.M., Grimmig, B. A., Weeber, E.J., Bickford, P.C., Gemma, C., 2011. CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. J. Neurosci. 31, 16241–16250.
Roumier, A., Bechade, C., Poncer, J.C., Smalla, K.H., Tomasello, E., Vivier, E., Gundelfinger, E.D., Triller, A., Bessis, A., 2004. Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse. J. Neurosci. 24, 11421–11428.
Roumier, A., Pascual, O., Béchade, C., Wakselman, S., Poncer, J.C., Réal, E., Triller, A., Bessis, A., Bechade, C., Wakselman, S., Poncer, J.C., Real, E., Triller, A., Bessis, A., 2008. Prenatal activation of microglia induces delayed impairment of glutamatergic synaptic function. PLoS One 3, e2595. doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002595.
Rousset, C.I., Chalon, S., Cantagrel, S., Bodard, S., Andres, C., Gressens, P., Saliba, E., 2006. Maternal exposure to LPS induces hypomyelination in the internal capsule and programmed cell death in the deep gray matter in newborn rats. Pediatr. Res. 59, 428–433. doi:http://dx.doi.org/10.1203/01.pdr.0000199905.08848.55.
Rymo, S.F., Gerhardt, H., Wolfhagen, S.F., Lang, R., Uv, A., Betsholtz, C., 2011. A two-way communication between microglial cells and angiogenic sprouts regulates angiogenesis in aortic ring cultures. PLoS One 6, e15846.
Salter, M.W., Beggs, S., 2014. Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. Cell 158, 15–24.
Samokhvalov, I.M., Samokhvalova, N.I., Nishikawa, S., 2007. Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis. Nature 446, 1056–1061.
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., 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., Stevens, B., 2013. The quad-partite synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. Glia 61, 24–36.
Schafer, D.P., Heller, C.T., Gunner, G., Heller, M., Gordon, C., Hammond, T., Wolf, Y., Jung, S., Stevens, B., 2016. Microglia contribute to circuit defects in Mecp2 null mice independent of microglia-specific loss of Mecp2 expression. Elife 5 doi:http://dx.doi.org/10.7554/elife.15224.
Schilling, T., Nitsch, R., Heinemann, U., Haas, D., Eder, C., 2001. Astrocyte-released cytokines induce ramification and outward K+ channel expression in microglia via distinct signalling pathways. Eur. J. Neurosci. 14, 463–473.
Schlegelmilch, T., Henke, K., Peri, F., 2011. Microglia in the developing brain: from immunity to behaviour. Curr. Opin. Neurobiol. 21, 5–10.
Schmidtmayer, J., Jacobsen, C., Miksch, G., Sievers, J., 1994. Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: membrane currents. Glia 12, 259–267. doi:http://dx.doi.org/10.1002/glia.440120403.
Schnell, L., Fearn, S., Klassen, H., Schwab, M.E., Perry, V.H., 1999. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. Eur. J. Neurosci. 11, 3648–3658. doi:http://dx.doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00792.x.
Schulz, C., Gomez, P.E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E., Pollard, J.W., Frampton, J., Liu, K.J., Geissmann, F., 2012. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. Science (80-.) 336, 86–90.

Schwarz, J.M., Bilbo, S.D., 2012. Sex, glia, and development: interactions in health and disease. Horm. Behav. 62, 243–253. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.02.018.
Scianni, M., Antonilli, L., Chece, G., Cristalli, G., Di Castro, M.A., Limatola, C., Maggi, L., 2013. Fractalkine (CX3CL1) enhances hippocampal N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) function via D-serine and adenosine receptor type A2 (A2AR) activity. J. Neuroinflammation. 10, 108.
Sedel, F., Bechade, C., Vyas, S., Triller, A., 2004. Macrophage-derived tumor necrosis factor alpha, an early developmental signal for motoneuron death. J. Neurosci. 24, 2236–2246.
Shatz, C.J., 1990. Competitive interactions between retinal ganglion cells during prenatal development. J. Neurobiol. 21, 197–211. doi:http://dx.doi.org/10.1002/neu.480210113.
Shatz, C.J., 2009. MHC class I: an unexpected role in neuronal plasticity. Neuron 64, 40–45. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.044.
Shemer, A., Erny, D., Jung, S., Prinz, M., 2015. Microglia plasticity during health and disease: an immunological perspective. Trends Immunol. 36, 614–624.
Sheridan, G.K., 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., Sato, K., 2014. Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. J. Neurosci. 34, 2231–2243.
Shklover, J., Levy-Adam, F., Kurant, E., 2015. Apoptotic cell clearance in development. Current Topics in Developmental Biology, doi:http://dx.doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.07.024 pp. 297–334.
Shklyar, B., Sellman, Y., Shklover, J., Mishnaevski, K., Levy-Adam, F., Kurant, E., 2014. Developmental regulation of glial cell phagocytic function during Drosophila embryogenesis. Dev. Biol. 393, 255–269. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.07.005.
Sierra, A., Encinas, J.M., Deudero, J.J., Chancey, J.H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L.S., Tsirka, S.E., 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., Neumann, H., 2013. Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. Front. Cell Neurosci. 7, 6. doi:http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2013.00006.
Sierra, A., Beccari, S., Diaz-Aparicio, I., Encinas, J.M., Comeau, S., Tremblay, M. Ève, 2014. Surveillance, phagocytosis, and inflammation: how never-resting microglia influence adult hippocampal neurogenesis. Neural Plast. 610343. doi:http://dx.doi.org/10.1155/2014/610343.
Sierra, A., de Castro, F., del R??o-Hortega, J., Rafael Iglesias-Rozas, J., Garrosa, M., Kettenmann, H., 2016. The Big-Bang for modern glial biology: translation and comments on Pio del Rio-Hortega 1919 series of papers on microglia. Glia 64, 1801–1840. doi:http://dx.doi.org/10.1002/glia.23046.
Sievers, J., Parwaresch, R., Wottge, H.U., 1994. Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: morphology. Glia 12, 245–258.
Sipe, G.O., Lowery, R.L., Tremblay, M.E., Kelly, E.A., Lamantia, C.E., Majewska, A.K., 2016. Microglial P2Y12 is necessary for synaptic plasticity in mouse visual cortex. Nat. Commun. 7, 10905.
Smith, S.E.P., Li, J., Garbett, K., Mirnics, K., Patterson, P.H., 2007. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. J. Neurosci. 27, 10695–11702. doi:http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2178-07.2007.
Smolders, S., Smolders, S.M.T., Swinnen, N., Gärtner, A., Rigo, J.-M., Legendre, P., Brône, B., 2015. Maternal immune activation evoked by polyinosinic: polycytidylic acid does not evoke microglial cell activation in the embryo. Front. Cell Neurosci. 9, 301. doi:http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2015.00301.
Sorge, R.E., Mapplebeck, J.C.S., Rosen, S., Beggs, S., Taves, S., Alexander, J.K., Martin, L. J., Austin, J.-S., Sotocinal, S.G., Chen, D., Yang, M., Shi, X.Q., Huang, H., Pillon, N.J., Bilan, P.J., Tu, Y., Klip, A., Ji, R.-R., Zhang, J., Salter, M.W., Mogil, J.S., 2015. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. Nat. Neurosci. 18, 1–5. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nn.4053.
Spassky, N., de, C.F., Le, B.B., Heydon, K., Queraud-LeSaux, F., Bloch-Gallego, E., Chedotal, A., Zalc, B., Thomas, J.L., 2002. Directional guidance of oligodendroglial migration by class 3 semaphorins and netrin-1. J. Neurosci. 22, 5992–6004.
Squarzoni, P., Oller, G., Hoeffel, G., Pont-Lezica, L., Rostaing, P., Low, D., Bessis, A., Ginhoux, F., Garel, S., 2014. Microglia modulate wiring of the embryonic forebrain. Cell Rep. 8, 1271–1279. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.042.
Stellwagen, D., Beattie, E.C., Seo, J.Y., Malenka, R.C., 2005. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha. J. Neurosci. 25, 3219–3228.
Stephan, A.H., Barres, B.A., Stevens, B., 2012. The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. Annu. Rev. Neurosci. 35, 369–389. doi:http://dx.doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113810.
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., Sher, A., Litke, A.M., Lambris, J.D., Smith, S.J., John, S.W., Barres, B.A., 2007. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. Cell 131, 1164–1178.
Swinnen, N., Smolders, S., Avila, A., Notelaers, K., Paesen, R., Ameloot, M., Brone, B., Legendre, P., Rigo, J.M., 2013. Complex invasion pattern of the cerebral cortex bymicroglial cells during development of the mouse embryo. Glia 61, 150–163.
Takahashi, K., Naito, M., Takeya, M., 1996. Development and heterogeneity of macrophages and their related cells through their differentiation pathways. Pathol. Int. 46, 473–485.
Tan, H., Cao, J., Zhang, J., Zuo, Z., 2014. Critical role of inflammatory cytokines in impairing biochemical processes for learning and memory after surgery in rats. J. Neuroinflamm. 11, 93. doi:http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-11-93.
Tremblay, M.E., Lowery, R.L., 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., Nimmerjahn, A., 2011. The role of microglia in the healthy brain. J. Neurosci. 31, 16064–16069.
Truman, L.A., Ford, C.A., Pasikowska, M., Pound, J.D., Wilkinson, S.J., Dumitriu, I.E., Melville, L., Melrose, L.A., Ogden, C.A., Nibbs, R., Graham, G., Combadiere, C., Gregory, C.D., 2008. CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. Blood 112, 5026–5036. doi:http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-06-162404.
Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., Yamashita, T., 2013. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. Nat. Neurosci. 16, 543–551. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nn.3358.
Ullian, E.M., Christopherson, K.S., Barres, B.A., 2004. Role for glia in synaptogenesis. Glia 47, 209–216.
Upender, M.B., Naegele, J.R., 1999. Activation of microglia during developmentally regulated cell death in the cerebral cortex. Dev. Neurosci. 21, 491–505.
Upton, A.L., Salichon, N., Lebrand, C., Ravary, A., Blakely, R., Seif, I., Gaspar, P., 1999. Excess of serotonin (5-HT) alters the segregation of ispilateral and contralateral retinal projections in monoamine oxidase A knock-out mice: possible role of 5-HT uptake in retinal ganglion cells during development. J. Neurosci. 19, 7007–7024.
Verkhratsky, A., Steardo, L., Parpura, V., Montana, V., 2015. Translational potential of astrocytes in brain disorders. Prog. Neurobiol. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.09.003.
Verney, C., Monier, A., Fallet-Bianco, C., Gressens, P., 2010. Early microglial colonization of the human forebrain and possible involvement in periventricular white-matter injury of preterm infants. J. Anat. 217, 436–448. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01245.x.
Vilhardt, F., Haslund-Vinding, J., Jaquet, V., Mcbean, G., 2016. Microglia antioxidant systems and redox signalling. Br. J. Pharmacol doi:http://dx.doi.org/10.1111/bph.13426.
Voineagu, I., Wang, X., Johnston, P., Lowe, J.K., Tian, Y., Horvath, S., Mill, J., Cantor, R. M., Blencowe, B.J., Geschwind, D.H., 2011. Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. Nature 474, 380–384. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nature10110.
Wake, H., Moorhouse, A.J., Jinno, S., Kohsaka, S., 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., Bechade, C., Roumier, A., Bernard, D., Triller, A., Bessis, A., 2008. Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. J. Neurosci. 28, 8138–8143.
Wang, Y., Szretter, K.J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., Barrow, A.D., Diamond, M.S., Colonna, M., 2012. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. Nat. Immunol. 13, 753–760.
Wang, J., Wegener, J.E., Huang, T., Sripathy, S., De Jesus-Cortex, H., Xu, P., Tran, S., Al, E., 2015. Wild-type microglia do not reverse pathology in mouse models of Rett syndrome. Nature 521, E1–E4. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nature10907.
Wollmer, M.A., Lucius, R., Wilms, H., Held-Feindt, J., Sievers, J., Mentlein, R., 2001. ATP and adenosine induce ramification of microglia in vitro. J. Neuroimmunol. 115, 19–27.
Wright, C.L., McCarthy, M.M., 2009. Prostaglandin E2-induced masculinization of brain and behavior requires protein kinase A AMPA/kainate, and metabotropic glutamate receptor signaling. J. Neurosci. 29, 13274–13282. doi:http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3603-09.2009.
Wright, C.L., Burks, S.R., McCarthy, M.M., 2008. Identification of prostaglandin E2 receptors mediating perinatal masculinization of adult sex behavior and neuroanatomical correlates. Dev. Neurobiol. 68, 1406–1419. doi:http://dx.doi.org/10.1002/dneu.20665.
Wu, L.J., Stevens, B., Duan, S., MacVicar, B.A., 2013. Microglia in neuronal circuits. Neural Plast. 2013, 586426.
Xu, D.-X., Chen, Y.-H., Wang, H., Zhao, L., Wang, J.-P., Wei, W., 2006. Tumor necrosis factor alpha partially contributes to lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal growth restriction and skeletal development retardation in mice. Toxicol. Lett. 163, 20–29. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.09.009.
Xu, J., Wang, T., Wu, Y., Jin, W., Wen, Z., 2016. Microglia colonization of developing zebrafish midbrain is promoted by apoptotic neuron and lysophosphatidylcholine. Dev. Cell 38, 214–222. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2016.06.018.
Yamada, J., Hayashi, Y., Jinno, S., Wu, Z., Inoue, K., Kohsaka, S., Nakanishi, H., 2008. Reduced synaptic activity precedes synaptic stripping in vagal motoneurons after axotomy. Glia 56, 1448–1462.
Yeo, W., Gautier, J., 2004. Early neural cell death: dying to become neurons. Dev. Biol. 274, 233–244.
Zhan, Y., Paolicelli, R.C., Sforazzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., Vyssotski, A.L., Bifone, A., Gozzi, A., Ragozzino, D., Gross, C.T., 2014. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. Nat. Neurosci. 17, 400–406.

van Berckel, B.N., Bossong, M.G., Boellaard, R., Kloet, R., Schuitemaker, A., Caspers, E., Luurtsema, G., Windhorst, A.D., Cahn, W., Lammertsma, A.A., Kahn, R.S., 2008. Microglia activation in recent-Onset schizophrenia: a quantitative (R)-[11C] PK11195 positron emission tomography study. Biol. Psychiatry 64, 820–822. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.04.025.

van Kleef, E.S., Gaspar, P., Bonnin, A., 2012. Insights into the complex influence of 5-HT signaling on thalamocortical axonal system development. Eur. J. Neurosci. 35, 1563–1572.

van Tilborg, E., Heijnen, C.J., Benders, M.J., van Bel, F., Fleiss, B., Gressens, P., Nijboer, C.H., 2016. Impaired oligodendrocyte maturation in preterm infants: potential therapeutic targets. Prog. Neurobiol. 136, 28–49. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.11.002.