



HAL
open science

Développement du réseau astroglial dans le cortex cérébral murin

Solène Clavreul

► **To cite this version:**

Solène Clavreul. Développement du réseau astroglial dans le cortex cérébral murin. Neurosciences. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS540 . tel-03015974

HAL Id: tel-03015974

<https://theses.hal.science/tel-03015974v1>

Submitted on 20 Nov 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 Sorbonne Université

Ecole doctorale Cerveau – Cognition – Comportement (ED 158)
Equipe *Neurogenèse et développement des circuits neuronaux*
Institut de la Vision, Paris, FRANCE

Sujet de la Thèse :

Développement du réseau astroglial dans le cortex cérébral murin

Thèse de doctorat en Neurosciences

Par **Solène Clavreul**

Dirigée par **Jean Livet et Karine Loulier**

Dans le but d'obtenir le grade de docteur de Sorbonne Université

Présentée et soutenue publiquement le 16 novembre 2018

Devant un Jury composé de :

Dr Pascale Durbec (DR – Rapporteuse)

Dr Alexandre Pattyn (CR-HDR – Rapporteur)

Dr Fiona Francis (DR – Examinatrice – Présidente du Jury)

Dr Gilles Bonvento (DR – Examineur)

Dr Karine Loulier (CR – Co-encadrante)

Dr Jean Livet (DR – Directeur de thèse)

Table des matières

Introduction.....	1
1. Historique	7
1.1. Découverte et premières descriptions de la glie	7
1.2. Fonctions connues des astrocytes au début du siècle dernier	9
2. Hétérogénéité des astrocytes	10
2.1. Hétérogénéité morphologique	10
2.2. Hétérogénéité moléculaire.....	12
2.3. Hétérogénéité fonctionnelle.....	17
2.4. Hétérogénéité inter-espèces.....	21
2.5. Hétérogénéité inter-régionale	24
2.6. Hétérogénéité intra-régionale	27
3. Le développement du cortex cérébral murin.....	28
3.1. Le développement du système nerveux	30
3.2. Les premières étapes du développement cortical	30
3.3. La phase neurogénique du développement cortical et la formation des différentes couches corticales	34
3.3.1. La génération des neurones corticaux	34
3.3.2. La formation des six couches corticales.....	35
3.3.3. Les acteurs moléculaires de la migration neuronale	37
3.4. La phase gliogénique	43
3.4.1. La production d'astrocytes par les cellules de la glie radiaire	43
3.4.2. La contribution des progéniteurs de la zone sous ventriculaire postnatale au réseau astrocytaire.....	46
3.4.3. La prolifération locale postnatale : une source majeure d'astrocytes....	47
3.4.4. D'autres sources d'astrocytes corticaux.....	50
3.5. La maturation du cortex cérébral	50
3.5.1. Maturation neuronale	51
3.5.2. Maturation astrocytaire.....	51
3.5.2.1. L'organisation astrocytaire à l'échelle du réseau	52
3.5.2.2. Le développement des astrocytes à l'échelle de la cellule	57
3.6. La génération des autres types cellulaires du cortex cérébral	63

4. Méthodes de suivi du lignage cellulaire.....	65
4.1. A l'échelle des populations	66
4.1.1. Les stratégies transgéniques	67
4.1.2. L'électroporation <i>in vivo</i>	69
4.2. A l'échelle du progéniteur unique : les analyses clonales.....	71
4.2.1. Les injections virales	71
4.2.2. Les stratégies multiclonaux	73
4.2.2.1. Les barcodes	73
4.2.2.2. Les techniques multicolores	74
5. Imagerie multicolore	87
5.1. Imagerie confocale	87
5.2. Imagerie biphotonique	88
5.3. Imagerie à feuille de lumière.....	90
5.3.1. Principes de l'imagerie à feuille de lumière	90
5.3.2. Techniques de transparaissance	92
Objectifs du projet.....	97
Résultats	99
PARTIE 1 : Etude de la formation du réseau astrocytaire cortical par une stratégie d'analyse multiclonaux	101
1. Marquage combinatoire clonal des astrocytes dans le cortex cérébral murin	101
1.1. La stratégie de marquage multicolore MAGIC Markers	101
1.2. Stabilité du marquage multicolore au cours du temps	103
1.3. Elaboration d'une stratégie de marquage spécifique des astrocytes.....	104
1.4. Analyse clonale des astrocytes corticaux	106
2. Composition des clones astrocytaires corticaux.....	109
2.1. Nombre d'astrocytes générés par des cellules souches neurales voisines	109
2.2. Sous-types d'astrocytes générés.....	111
3. Positionnement des clones astrocytaires dans le cortex cérébral.....	113
4. Dispersion et prolifération des astrocytes dans le parenchyme cortical ..	115
4.1. La dynamique de prolifération et de dispersion pendant la première semaine postnatale.....	116
4.1.1. Dispersion	116

4.1.2. Prolifération.....	118
4.1.3. Vers une analyse plus fine des phases prolifératives et dispersives de la première semaine postnatale.....	123
4.2. La phase de maturation astrocytaire après la première semaine postnatale	125
4.2.1. Dispersion des clones d'astrocytes : analyse sur coupes sériées.....	125
4.2.2. Elaboration d'un protocole d'imagerie multicolore tridimensionnelle	127
4.2.2.1. Transparenciation d'échantillons multicolores	128
4.2.2.2. Validation d'un dispositif associant microscope bi-photonique et coupe automatique	132
4.2.3. Analyses clonales tridimensionnelles.....	132
4.2.3.1. Dispersion 3D	133
4.2.3.2. Organisation	137
5. Maturation des astrocytes à l'échelle de la cellule après la première semaine postnatale	139
5.1. Analyses volumétriques d'astrocytes.....	140
5.2. Analyse de la complexité des branchements astrocytaires	140
PARTIE 2 : Caractérisation des sources de production des astrocytes corticaux	145
1. Le facteur de transcription Olig2 : marqueur précoce du lignage astrocytaire cortical.....	145
1.1. Olig2 : marqueur précoce d'astrocytes corticaux.....	145
1.2. Les astrocytes générés par le lignage Olig2 proviennent des progéniteurs de la zone ventriculaire dorsale.....	147
2. Contribution des progéniteurs postnatals au lignage astrocytaire.....	151
2.1. Génération d'astrocytes corticaux par la zone sous ventriculaire dorsale postnatale.....	151
2.2. Contribution postnatale des cellules Nestin+ au réseau astrocytaire	155
PARTIE 3 : Exploration des mécanismes de régulation du développement du réseau astrocytaire.....	161
1. Perturbation mosaïque de l'organisation corticale par l'éphrine B1 intégrée aux MAGIC Markers.....	161
2. Perturbation mosaïque de l'organisation corticale par l'éphrine B1 dissociée des MAGIC Markers	164

3. Analyse de la perturbation par l'éphrine B1 <i>in vitro</i>	164
Conclusion	168
Discussion & Perspectives	169
1. Hétérogénéité des progéniteurs corticaux	171
1.1. Nombre de cellules générées par les progéniteurs corticaux	172
1.2. Sous-types astrocytaires et autres cellules générés par les progéniteurs corticaux	176
2. Maturation du réseau astroglial	182
2.1. Organisation du réseau astroglial au cours du développement	182
2.2. Maturation morphologique	183
3. Hétérogénéité des astrocytes au sein des différentes couches corticales 186	
3.1. Hétérogénéité morphologique	187
3.2. Hétérogénéité moléculaire et fonctionnelle	187
3.3. Hétérogénéité proliférative	189
4. Origine de l'hétérogénéité astrocytaire	190
4.1. Contribution des progéniteurs prénataux au réseau astroglial	190
4.2. Contribution des progéniteurs postnataux au réseau astroglial	193
5. Mécanismes de régulation de la migration des astrocytes dans le cortex cérébral murin	196
6. Le développement astroglial, un enjeu de santé publique	198
Conclusions	202
Remerciements	205
Références	209
Annexes	241

Table des illustrations

Figure 1. Taille du cerveau chez les mammifères.....	5
Figure 2. Premières descriptions des astrocytes.	8
Figure 3. Les astrocytes: une population morphologiquement hétérogène.	11
Figure 4. Les marqueurs d'astrocytes.....	15
Figure 5. Caractéristiques spécifiques des astrocytes humains.	23
Figure 6. Diversité des morphologies astrocytaires au sein du système nerveux central.....	25
Figure 7. Densité astrocytaire obtenue avec trois méthodes de marquage.	26
Figure 8. Morphologies gliales dans le cortex cérébral murin.....	29
Figure 9. Développement du système nerveux central.....	31
Figure 10. Du neuroépithélium aux cellules de la glie radiaire: initiation du développement cortical.....	32
Figure 11. Formation "inside out" des couches corticales.	36
Figure 12. Les six couches horizontales du cortex cérébral.	38
Figure 13. Mécanismes régulant la migration radiale dans le cortex cérébral.	40
Figure 15. L'éphrine B1 contrôle la distribution colonnaire des neurones pyramidaux par restriction de leur migration tangentielle.	42
Figure 14. Les multiples origines des astrocytes.	44
Figure 16. Prolifération locale des astrocytes corticaux.....	48
Figure 17. Spécification de l'hétérogénéité astrocytaire régionale dans la moelle épinière.....	53
Figure 18. Origines développementales de l'hétérogénéité des astrocytes parenchymateux et de la V-SVZ chez l'adulte.	55
Figure 19. Génération coïncidente de neurones pyramidaux et d'astrocytes protoplasmiques dans des colonnes néocorticales.	56
Figure 20. Les astrocytes occupent des territoires individuels distincts.....	58
Figure 21. Morphogenèse des astrocytes au cours du développement.....	61
Figure 22. La stratégie de marquage mosaïque bicolore MADM.....	75
Figure 23. La stratégie multicolore Brainbow.....	79
Figure 24. Analyses multiclonales avec la souris Confetti.	81
Figure 25. Stratégies d'analyses multiclonales StarTrack et CLoNE.	82
Figure 26. Les transgènes multicolores MAGIC Markers.	85
Figure 27. Spectres d'excitation et d'émission des fluorphores associés aux MAGIC Markers.....	89
Figure 28. Imagerie biphotonique multicolore par mélange de longueurs d'ondes... ..	91
Figure 29. Microscopie à feuille de lumière biphotonique multicolore.....	93
Figure 30. Méthodologie des techniques de transparençation de tissus.....	95
Figure 31. Astrocyte multicolor labeling following mouse <i>in utero</i> electroporation of MAGIC Markers in cortical progenitors.	102
Figure 32. Astrocyte-specific labeling strategy using mouse <i>in utero</i> electroporation of modified MAGIC Markers.	105

Figure 33. Clonal astrocyte analysis following mouse <i>in utero</i> electroporation of MAGIC Markers in cortical progenitors.	106
Figure 34. Astrocyte clone size in the postnatal mouse cerebral cortex.	110
Figure 35. Astrocyte subtypes generated by neighbouring cortical neural progenitors.	113
Figure 36. Localization of cortical progenitors' astrocyte descent.	114
Figure 37. Protoplasmic astrocyte clone dispersion during the first postnatal week.	117
Figure 38. Proliferation dynamics during the first postnatal week.	118
Figure 39. Doublets are not a reliable indicator of recent division and reveal cell clustering during development.	120
Figure 40. MAGIC Markers labeling triggered by inducible Cre strategies.	124
Figure 41. Dispersion of protoplasmic astrocyte clones during the three first postnatal weeks.	126
Figure 42. Clearing and imaging strategies for multicolor large volume analysis. ...	131
Figure 43. Astrocyte clone dispersion analysis with multicolor Chrom-SMP imaging.	135
Figure 44. Tridimensional analysis of astrocyte clone dispersion and volume using Delaunay triangulations.	136
Figure 45. Tridimensional organization of clonally –related cells in the cerebral cortex.	138
Figure 46. Cellular volume of cortical protoplasmic astrocytes.	141
Figure 47. High resolution protoplasmic astrocyte morphology analysis.	142
Figure 48. Olig2 transcription factor is an early marker of cortical astrocytes.	147
Figure 49. Olig2 derived astrocytes arise from dorsal cortical progenitors.	151
Figure 50. Contribution of postnatal SEZ progenitors to the generation of cortical astrocytes.	152
Figure 51. Astrocytes scatter in the embryonic cortical parenchyma.	154
Figure 52. Contribution of postnatal Nestin+ cells to the astrocyte network.	156
Figure 53. Dual contribution of embryonic and Nestin+ postnatal progenitors to the generation of cortical astrocytes.	158
Figure 54. A new model for astrocyte development in the mouse cerebral cortex. ...	160
Figure 55. Long term disruption of cortical organization with EphrinB1.	162
Figure 56. Short term disruption of local cortical organization with EphrinB1.	165
Figure 57. Expression and toxicity tests <i>in vitro</i> of Cag-EfnB1-iRFP.	166
Figure 58. Potentialité des progéniteurs corticaux individuels à générer plusieurs sous-types gliaux.	179
Figure 59. Stratégies d'étude du lignage commun entre astrocytes et neurones dans le cortex cérébral.	181
Figure 60. Stratégies d'analyse de la morphologie astrocytaire.	184

Introduction

Introduction générale

Qu'est ce qui rend les humains si uniques ? Les mystères de l'intelligence suscitent de nombreuses interrogations depuis des millénaires. L'être humain étant loin d'avoir le cerveau le plus volumineux parmi les mammifères, ni le rapport taille du cerveau/masse corporelle, ni la taille du cerveau seule, elle-même très variable entre individus, ne peuvent expliquer l'intelligence humaine. Au cours de l'évolution, le cortex cérébral des mammifères s'est agrandi de manière plus importante que l'ensemble du cerveau (Figure 1) (Herculano-Houzel, 2014), formant chez de nombreuses espèces des circonvolutions et allant chez l'Homme jusqu'à représenter 80 à 90% du volume cérébral. Au sein du cortex cérébral, l'information sensorielle est traitée, intégrée et stockée, engendrant différents types de comportements, faisant de cette structure le siège d'activités cognitives complexes, propres à l'Homme, dont la réflexion, l'art et l'humour.

Ce cortex cérébral est composé de types cellulaires variés parmi lesquels les neurones, bien connus, qui transmettent l'influx nerveux, et les cellules gliales dont font partie les astrocytes. Formant une des populations cellulaires les plus importantes du cerveau chez les mammifères, les astrocytes tapissent le tissu cérébral d'un réseau en apparence continu. L'augmentation spectaculaire du nombre de cellules gliales et de leur complexité au cours de l'évolution suggère qu'elles ont un rôle dans l'acquisition de certaines facultés cognitives propres aux humains. Longtemps considérées comme de simples cellules à fonction de support et de nutrition pour les neurones, il est largement admis aujourd'hui qu'elles ont d'autres rôles essentiels, notamment dans le développement du cerveau, la formation et le fonctionnement des synapses, mais aussi le contrôle du débit sanguin et la formation de la barrière hémato-encéphalique. Elles sont de plus impliquées dans de nombreuses pathologies et troubles neurodéveloppementaux ainsi que dans la réponse aux lésions du système nerveux central. Il reste encore beaucoup à découvrir quant à leurs caractéristiques moléculaires et fonctionnelles mais il est certain qu'elles forment une population hétérogène en termes de morphologie, fonction, et expression génique qu'il est important de comprendre afin de faire progresser la neurobiologie et la connaissance du fonctionnement du cerveau humain.

D'où viennent ces différentes fonctions, sont-elles prédéterminées dès le stade cellule souche ? La question du développement des astrocytes a été longtemps mise de côté à cause de leurs origines multiples, des différences observées entre espèces. Un autre aspect rendant leur étude difficile, est l'absence d'un point développemental final, à partir duquel les cellules seraient clairement différenciées et identifiables, morphologiquement ou à l'aide de marqueurs moléculaires : en effet, contrairement aux neurones ou aux oligodendrocytes, les astrocytes conservent un potentiel mitotique et changent d'état pour devenir réactifs dans des conditions pathologiques ou de lésions. S'ils ne semblent donc pas figés sur le plan développemental, moléculaire et fonctionnel, les stratégies de biologie moléculaire et techniques d'imagerie actuellement disponibles permettent à présent d'étudier la mise en place des astrocytes dans le cortex cérébral, de la cellule souche au réseau mature afin, peut-être, d'élucider les origines de leur hétérogénéité.

Cette introduction abordera tout d'abord l'hétérogénéité des astrocytes à différentes échelles, puis le développement du cortex cérébral murin et la gliogenèse en particulier, pour terminer par les stratégies d'analyses du lignage cellulaire en combinant outils de pointe en biologie moléculaire et imagerie.

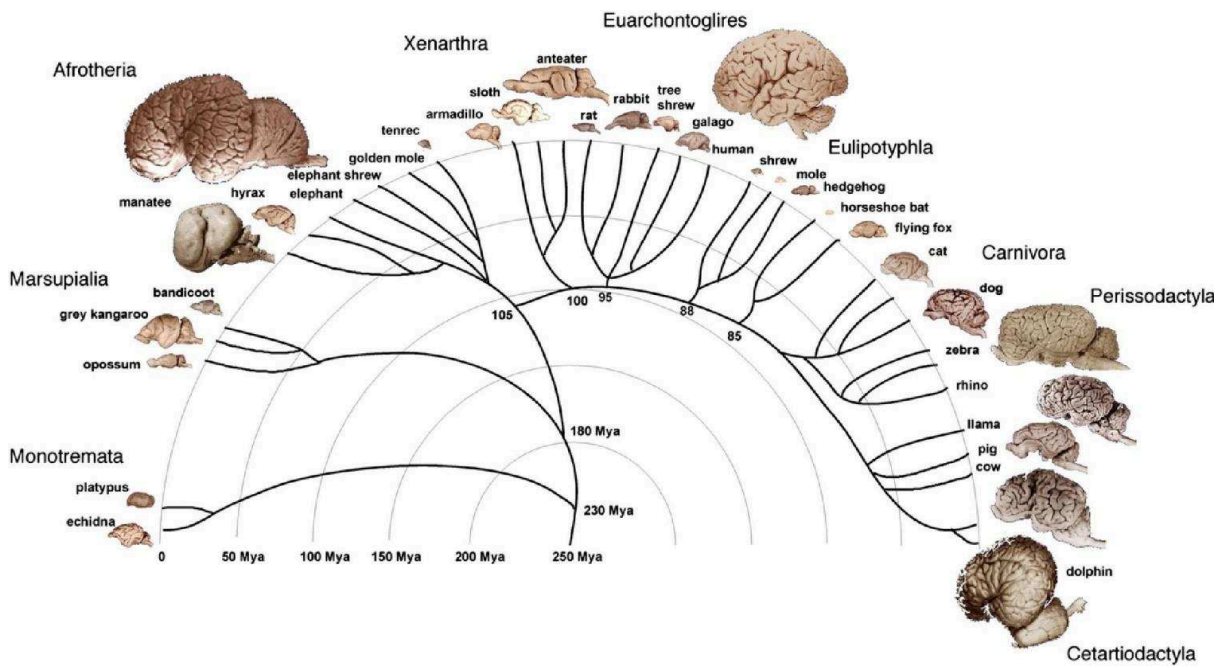


Figure 1. Taille du cerveau chez les mammifères.

Les cerveaux de grande taille apparaissent plusieurs fois de manière indépendante chez les mammifères au cours de l'évolution. Des exemples d'espèces sont illustrés pour chaque grand groupe de mammifères. (d'après *Herculano-Houzel, 2014*)

1. Historique

Pour comprendre la manière dont les cellules gliales sont perçues et étudiées aujourd'hui, il faut remonter à l'époque de leur première description, il y a plus d'un siècle. Les théories de l'époque, essentiellement basées sur des descriptions morphologiques, étaient difficilement vérifiables. Les outils technologiques modernes ont apporté certaines réponses mécanistiques. Cependant, nombreuses sont les questions déjà posées à cette époque auxquelles les chercheurs essaient encore de répondre aujourd'hui.

1.1. Découverte et premières descriptions de la glie

Les cellules gliales furent probablement observées et illustrées pour la première fois par le médecin, botaniste et physiologiste français Henri Dutrochet en 1824 grâce à ses études des mollusques (Dutrochet, 1824; Fan and Agid, 2018) (Figure 2). La notion de "Nervenkitz" ou neuroglie fut employée pour la première fois par le pathologiste allemand Rudolf Virchow en 1846 pour décrire une substance conjonctive retrouvée dans le cerveau, la moelle épinière et les nerfs sensoriels et dans lesquels les éléments nerveux seraient enrobés (Virchow, 1846, 1856; Somjen, 1988; Young, 1991; Kettenmann and Verkhratsky, 2008). Il exposa ses découvertes publiquement en 1858 (Virchow, 1858) pour décrire cette substance pénétrant dans la masse cérébrale, remplissant tous les interstices autour des cellules nerveuses et leurs prolongements, mais séparant également le tissu nerveux des vaisseaux sanguins. C'est le neuroanatomiste allemand Otto Deiters qui identifia le premier des cellules non neuronales, c'est-à-dire dépourvues d'axone, selon lui, dans le système nerveux (Deiters, 1865; Ramón y Cajal, 1909). Elles furent par la suite nommées les cellules de Deiters. Cette distinction neurones-glie fut accentuée par le médecin italien Camillo Golgi grâce à sa méthode de marquage au nitrate d'argent, mise au point en 1873.

D'après l'anatomiste et histologiste hongrois Mihály von Lenhossék (von Lenhossék, 1891), Camillo Golgi fit le premier référence à des fibres s'étirant radialement depuis les cellules épendymaires jusqu'à la surface piale de la moelle épinière embryonnaire, mais il attribua au scientifique norvégien Fridtjof Nansen l'idée que les cellules de Deiters dérivent en réalité de l'épendyme embryonnaire, théorie confirmée par Ramón y Cajal (Ramón y Cajal, 1913) et toujours acceptée

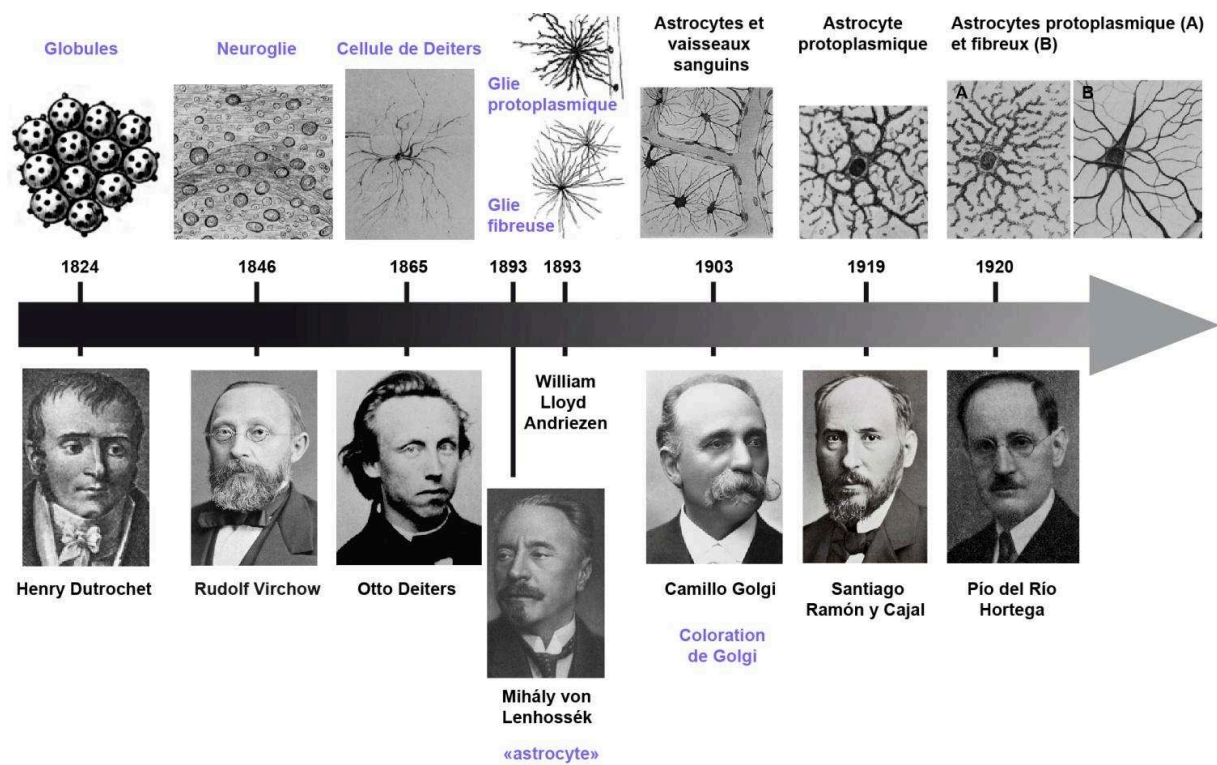


Figure 2. Premières descriptions des astrocytes.

Des petits globules de Dutrochet aux dessins des différents sous types gliaux de del Río Hortega : les premières descriptions de la glie et des astrocytes. (*d'après Dutrochet, 1824 ; Virchow, 1858 ; Deiters, 1865 ; Andriezen, 1893 ; Somjen, 1988 Golgi, 1903 ; Ramón y Cajal ; 1919 ; del Río Hortega 1920 ; et Fan et Agid, 2018*)

aujourd'hui. Cette interprétation changea la perception de la glie, définie comme d'origine ectodermique et non plus comme un tissu conjonctif, et séparée en deux catégories par le médecin, histologiste et pathologiste espagnol Nicolás Achúcarro y Lund (Achúcarro y Lund, 1915) : la glie épendymaire et la glie autonome (détachée de la couche épendymaire). Si le médecin suisse Wilhelm His suggéra ensuite que les fibres gliales embryonnaires servent de guide à la migration des neurones en développement (His, 1889), il fallut attendre une centaine d'années pour que les travaux de Pasko Rakic décrivent ce phénomène (Rakic, 1971, 1972).

On doit le terme d'astrocyte, *-astro* pour étoile et *-cyte* pour cellule à Mihály von Lenhossék (von Lenhossék, 1893), en référence à leurs multiples et complexes prolongements donnant à ces cellules une forme étoilée. Alors que Camillo Golgi décrivit dès 1885 différents types de glie (Golgi, 1885), c'est plus tard que William Lloyd Andriezen nomma et distingua la glie fibreuse, principalement présente dans la substance blanche, de la glie protoplasmique présente dans la substance grise (Andriezen, 1893). Par la suite, le médecin et chercheur espagnol Pío del Río Hortega distingua le premier les oligodendrocytes de la microglie et des astrocytes grâce à l'amélioration de méthodes de marquage basées sur l'imprégnation métallique (del Río Hortega, 1918, 1920, 1921). À partir de leurs observations morphologiques, quelques savants s'avancèrent à émettre plusieurs théories concernant la fonction des cellules gliales.

1.2. Fonctions connues des astrocytes au début du siècle dernier

Virchow concevait la glie comme un élément donnant une forme au cerveau, en maintenant les cellules ensemble. D'après Camillo Golgi (Golgi, 1885), la présence des prolongements gliaux au niveau des vaisseaux sanguins étaye cette théorie selon laquelle les cellules gliales servent à nourrir les neurones, avec d'un côté des terminaisons gliales apposées aux vaisseaux sanguins, et de l'autre des prolongements protoplasmiques assimilés à des dendrites, et formant un continuum avec les dendrites des cellules nerveuses. Il pensait à l'époque que, contrairement à l'axone, les dendrites n'ont pas de rôle dans la signalisation nerveuse et servent à acheminer les nutriments jusqu'au corps cellulaire et à l'axone, faisant des cellules gliales les intermédiaires parfaites entre vaisseaux et neurones. Santiago Ramón y Cajal, quant à lui pensait au début que ces cellules forment une chaîne de tissu nerveux, servant de charpente et d'isolant, agissant en tant que support et protection

des cellules nerveuses et des vaisseaux sanguins (Ramón y Cajal, 1909), et rejetait la théorie du pathologiste allemand Carl Weigert selon laquelle la glie sert à remplir les espaces vides entre les neurones (Weigert, 1895). Cajal admit cependant que la glie devait avoir de nombreux autres rôles encore inconnus dans le système nerveux. L'italien Emilio Lugaro suggéra quant à lui que la glie pouvait supprimer et détoxifier les produits finaux du métabolisme neuronal (Lugaro, 1907).

Les cellules gliales étant dépourvues d'axone, ne formant pas de nerfs connectés aux organes et aux muscles, et ne générant pas de potentiels d'action détectables par les techniques d'enregistrement initiales, leur étude physiologique n'a commencé que dans les années 1950, bien longtemps après celle des neurones, alors qu'ils avaient été décrits à la même période, et souvent par les mêmes savants. Ainsi le concept de population homogène composée de cellules de support, basé sur des observations essentiellement morphologiques domina la pensée dans le domaine des neurosciences pendant plusieurs dizaines d'années et alimenta un désintérêt général pour la physiologie de ces cellules, excepté dans des cadres pathologiques (Fan and Agid, 2018). Les modèles cérébraux basés sur la fonction neuronale furent communément adoptés.

2. Hétérogénéité des astrocytes

Depuis les années 1990 de nombreuses études sont venues ébranler ces modèles de fonctionnement cérébral et décrire les nombreuses fonctions des astrocytes qui vont bien au-delà des rôles nutritif et de support qui leur étaient accordés jusque là. On sait aujourd'hui que les astrocytes forment une population très hétérogène avec des morphologies et des propriétés moléculaires et fonctionnelles distinctes. Cette hétérogénéité est retrouvée à plusieurs échelles: entre espèces, entre régions du cerveau, au sein d'une même région mais également sur le plan développemental. (Emsley and Macklis, 2006; Matyash and Kettenmann, 2010; Chaboub and Deneen, 2012; Oberheim et al., 2012; Bayraktar et al., 2015).

2.1. Hétérogénéité morphologique

Dès la fin du 19^e siècle, l'hétérogénéité morphologique des astrocytes est reconnue grâce aux nombreux dessins de Santiago Ramón y Cajal, Camillo Golgi et

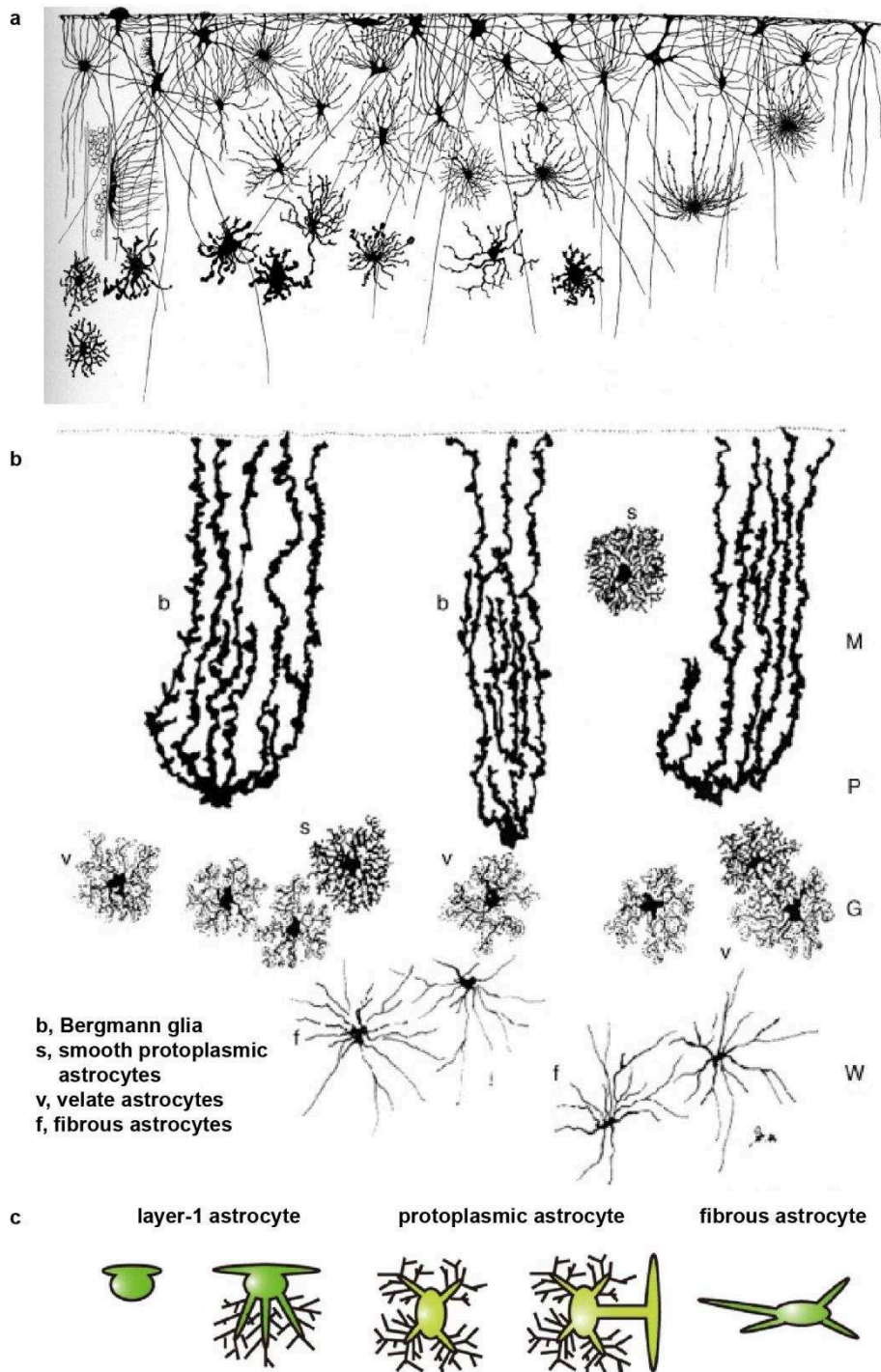


Figure 3. Les astrocytes: une population morphologiquement hétérogène.

(a) Cellules gliales marquées par la technique de Golgi dans le cortex cérébral humain (Retzius, 1894). (b) Différents sous-types d'astrocytes marqués par la technique de Golgi dans le cervelet humain. M: molecular layer; P: Purkinje cell layer; G: granule cell layer; W: white matter (Ramón y Cajal). (c) Représentations schématiques des sous-types d'astrocytes présents dans le cortex cérébral murin (Tabata, 2015).

Gustaf Retzius (Retzius, 1894; Matyash and Kettenmann, 2010; Kimelberg and Nedergaard, 2010) (Figure 3a), et les astrocytes fibreux sont déjà distingués des astrocytes protoplasmiques. Les astrocytes protoplasmiques se trouvent dans la substance grise et sont caractérisés par des prolongements complexes occupant un grand volume et dont les plus fines branches ne peuvent pas être résolues en microscopie classique. Ils étendent leur arborisation jusqu'aux vaisseaux sanguins et les enveloppent pour former la paroi externe de la barrière hémato-encéphalique. Les astrocytes fibreux quant à eux se trouvent dans la substance blanche et possèdent des prolongements moins nombreux et plus épais, orientés le long des fibres nerveuses et contactent également les vaisseaux sanguins (Reichenbach and Wolburg, 2004; Matyash and Kettenmann, 2010). D'autres sous-types d'astrocytes, identifiés par leurs morphologies distinctes, ont ensuite été décrits comme la glie de Müller dans la rétine et la glie de Bergmann dans le cervelet (Figure 3b).

À ces différents sous-types d'astrocytes viennent s'ajouter les astrocytes de la couche corticale I, ou astrocytes de la surface piale. Ils peuvent présenter une morphologie complexe et fournie comme les astrocytes protoplasmiques, ou avoir une forme beaucoup plus simple, plus proche de celle des astrocytes de type fibreux. Leurs prolongements et/ou leur corps cellulaire couvrent la surface externe du parenchyme cortical au niveau de la surface piale et forment la glia limitans, au contact des méninges (Tabata, 2015) (Figure 3c). Les différents sous-types astrocytaires mentionnés ci-dessus ont été d'abord distingués grâce à leur morphologie (Emsley and Macklis, 2006; Sofroniew and Vinters, 2010) puis par les différents marqueurs moléculaires qu'ils expriment, détaillés ci-dessous.

2.2. Hétérogénéité moléculaire

Le marqueur GFAP

Une des grandes difficultés de l'étude du développement des astrocytes est qu'en dépit de la disponibilité de nombreux marqueurs pour ces cellules, il n'existe pas à ce jour de marqueur spécifique de tous les astrocytes qui ne soit exprimé dans aucun autre type cellulaire. Alors que les études développementales des neurones et des oligodendrocytes ont bénéficié de marqueurs spécifiques de sous-types et de stades développementaux, la plupart de celles concernant les astrocytes se sont basées jusqu'à présent sur l'expression de la protéine acide fibrillaire gliale (Glial Fibrillary Acidic Protein ou GFAP), une protéine des filaments intermédiaires

différentiellement exprimée par les cellules astrogliales et un marqueur d'astrocytes différenciés plutôt tardif (Bignami et al., 1972; Molofsky et al., 2012). En effet, beaucoup d'astrocytes n'expriment pas la GFAP de manière détectable en condition normale. Son expression varie suivant les zones cérébrales, se révélant par exemple forte dans l'hippocampe et faible dans le thalamus (Khakh and Sofroniew, 2015). Dans le cortex cérébral, la GFAP, qui ne marque pas le corps cellulaire des astrocytes, est beaucoup plus faiblement exprimée dans les astrocytes de type protoplasmique, où elle n'est parfois retrouvée que dans les terminaisons en contact avec les vaisseaux sanguins, que dans les astrocytes de type fibreux, qui l'expriment tardivement (Figure 4a-b) (Miller and Raff, 1984; Oberheim et al., 2009). Les astrocytes de la surface piale quant à eux expriment fortement la GFAP (Khakh and Sofroniew, 2015). Il y a plusieurs autres limites à l'utilisation de ce marqueur: la GFAP est aussi retrouvée dans les cellules adultes multipotentes de type B de la zone sous épendymaire chez les rongeurs (Doetsch et al., 1997), et est activée dans les astrocytes réactifs (activés en réponse à une pathologie) (Eng et al., 2000) et dans les astrocytes en culture (Imura et al., 2006).

Les marqueurs précoces NFIA et GLAST

D'autres marqueurs ont depuis été identifiés, avec chacun leurs limites (Molofsky et al., 2012). Parmi ces marqueurs, le facteur de transcription NFIA, qui contrôle le début de la gliogenèse dans la moelle épinière (Deneen et al., 2006) ainsi que le transporteur astrocytaire de glutamate et d'aspartate GLAST (GluT-1 ou EAAT1) qui est déjà présent dans les cellules de la glie radiaire de la moelle épinière en développement (Shibata et al., 1997). Toutefois, ces marqueurs, exprimés dès le jour embryonnaire 11.5 (E11.5), ne deviennent complètement spécifiques des astrocytes que plusieurs jours après différenciation dans la zone ventriculaire, et sont retrouvés dans d'autres types cellulaires, notamment dans certains précurseurs d'oligodendrocytes (Molofsky et al., 2012).

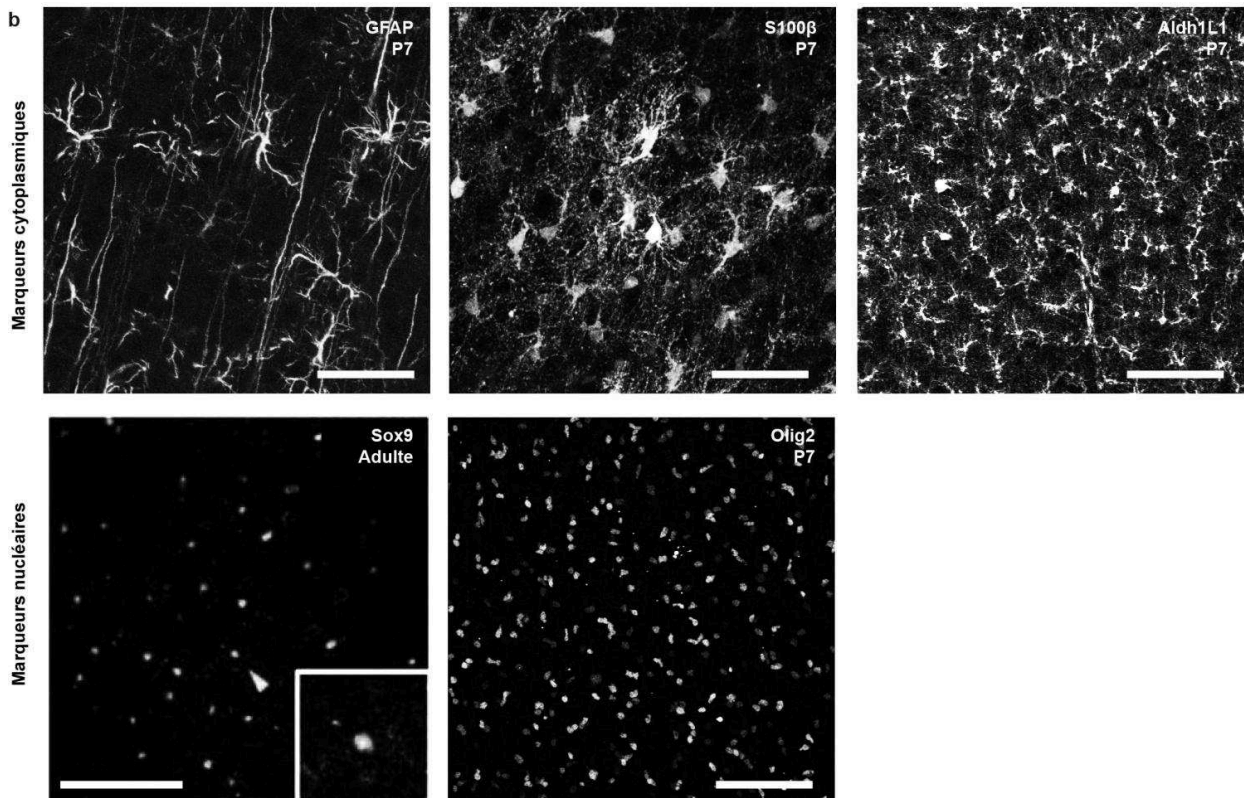
S100 β et les autres marqueurs d'astrocytes

Parmi les autres marqueurs astrocytaires, on peut citer le très connu S100 β : marqueur tardif, cet antigène est très présent dans les astrocytes protoplasmiques (Figure 4a-b), où il présente l'avantage de marquer le corps cellulaire, mais est absent dans ceux de la surface piale. Il est caractéristique des astrocytes matures et ne marque pas les cellules souches neurales (Raponi et al., 2007; Ihrie and Alvarez-

a

Marker	Expression onset	Advantages	Caveats
Glast	mE11.5, cE5	Early expression	Also expressed in some oligodendrocyte precursors
NFI A/B	mE11.5, cE5–cE6	Early expression	Also expressed in oligodendrocyte precursors and mature motor neurons
FABP7/BLBP	mE8–mE9, cE2	Early expression	Also expressed during neurogenic stages in radial glia
FGFR3	mE9.5, cE3	Early expression	Also expressed during neurogenic stages in radial glia and oligodendrocyte precursors
Sox9	mE9.5–E10, cE3–cE4	Early expression	As above
Reelin/slit	cE4	Early expression; subtype specificity	Also expressed by neurons; uncharacterized outside spinal cord
Aldhl1	mE9.5	Early expression that persists in mature astrocytes; labels both fibrous and protoplasmic astrocytes	Incompletely characterized; expressed early in radial glia, (unclear whether these are fated to become astrocytes only)
Id3	mE14.5	Early expression	Also expressed in some oligodendrocyte precursors
Aldolase C	mE15	Antibody detects fibrous and protoplasmic astrocytes	Also expressed in pial and purkinje cells
GFAP	mE17.5–mE18.5	Robust, well-characterized marker of mature fibrous astrocytes and reactive astrocytes	Poorly labels protoplasmic astrocytes; turned on relatively late in development
S100 β	mE15.5–mE16.5	Robust, good antibodies available	Also labels oligodendrocytes; turned on late
Aquaporin-4	mE18	Subtype specific? (preferentially labels endfeet near blood vessels and pia)	Also in ependymal cells; white matter-restricted
CD44	E18.5–P0, cE10	Cell surface marker potentially useful for flow cytometry	Incompletely characterized
Glutamine synthetase	Embryonic to early postnatal	Expressed in fibrous and protoplasmic subtypes	Incompletely characterized

b



(légende sur la page suivante)

Figure 4. Les marqueurs d'astrocytes.

(a) Marqueurs d'astrocytes et de leurs progéniteurs chez la souris et le poulet. Le début de l'expression de chaque marqueur varie suivant les régions du système nerveux central, généralement plus précoce dans la moelle épinière que dans le cerveau antérieur. (mE) mouse embryonic day ; (cE) chick embryonic day ; (P) postnatal day; (NFIA) Nuclear factor 1 A-type protein; (FABP7) Fatty acid binding protein 7; (BLBP) Brain Lipid Binding Protein; (Id3) ID helix-loop-helix protein 3; (GFAP) Glial Fibrillary Acidic Protein; (S100 β) S100 calcium-binding protein B; (FGFR3) Fibroblast growth factor receptor 3. (d'après *Molofsky et al., 2012*). (b) Immunomarquages GFAP, S100 β , Aldh1L1, Sox9 et Olig2 dans le cortex cérébral murin.

GFAP, S100 β , Aldh1L1 et Olig2 : Images personnelles ; Sox9: (*Sun et al. 2017*). Barres d'échelle: 100 μ m.

Buylla, 2008). Malheureusement il marque aussi certains oligodendrocytes (Hachem et al., 2005). L'Aldolase C est quant à elle robustement exprimée dans les astrocytes protoplasmiques de la substance grise (Bachoo et al., 2004; Tien et al., 2012). On peut également citer FGFR3 (Pringle et al., 2003), FABP7 (ou BLBP) (Feng et al., 1994; Owada et al., 1996; Hartfuss et al., 2001; Anthony et al., 2004; Owada, 2008), Aquaporin-4 (uniquement dans la substance blanche (Wolburg et al., 2009) et Sox9 (Sun et al., 2017) (Figure 4a-b). Cependant nombre de ces marqueurs sont également exprimés dans la glie radiaire pendant la phase neurogénique (FABP7, FGFR3, Sox9 (Stolt, 2003)), par des précurseurs d'oligodendrocytes (FGFR3, Sox9) voire par des cellules épendymaires (Aquaporin-4, Sox9 (Scott et al., 2010)) ou les neurones (Aldolase C).

Le nouveau marqueur ALDH1L1

Avec l'arrivée des nouvelles techniques d'analyse transcriptomique (Cahoy et al., 2008; Doyle et al., 2008; Fu et al., 2009), le séquençage des ARN isolés à partir de populations d'astrocytes purifiés a permis la découverte de nouveaux marqueurs astrocytaires, à l'image de l'ALDH1L1 (Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member L1) (Anthony and Heintz, 2007; Cahoy et al., 2008; Molofsky et al., 2013). A priori exprimée dès E9,5, cette enzyme présente l'avantage d'être présente à la fois dans les astrocytes fibreux et protoplasmiques (Figure 4a-b). Cependant, elle semble être exprimée aussi par les cellules de la glie radiaire et les cellules souches neurales adultes (Foo and Dougherty, 2013).

Le cas Olig2

Un autre marqueur est encore aujourd'hui débattu : le facteur de transcription à motifs hélice-boucle-hélice (bHLH) Olig2 (Zhou et al., 2000). Il est exprimé dans les zones ventriculaires et sous ventriculaires des éminences ganglionnaires latérale et médiane de E10,5 à E14,5 puis dans la substance grise après E15,5 (Figure 4b). Il joue un rôle essentiel dans la différenciation des motoneurones et des oligodendrocytes dans la moelle épinière embryonnaire (Takebayashi et al., 2002) et est avant tout un marqueur des oligodendrocytes et de leurs précurseurs. Cependant Olig2 serait également important pour la formation des astrocytes de la substance blanche, sans l'être pour celle des astrocytes de la substance grise corticale (Cai et al., 2007). Les auteurs de cette étude en déduisent que ces deux sous-populations, morphologiquement et spatialement distinctes, ont des sources développementales différentes. Olig2 serait spécifiquement exprimé dans les progéniteurs gliaux de la zone sous-épendymaire postnatale et empêcherait même la différenciation neuronale (Marshall et al., 2005). Les cellules Olig2+ verraient leur potentialités varier au cours du développement et présenteraient une hétérogénéité régionale concernant le devenir de leur descendance, non nécessairement Olig2+ (Ono et al., 2008). Des travaux très récents suggèrent qu'il existe une sous-population d'astrocytes issue d'un lignage Olig2+ dans le cerveau adulte, différente des astrocytes exprimant la GFAP de par son profil d'expression. Cette sous-population pourrait également être distincte fonctionnellement des autres astrocytes, avec une implication dans la transmission neuronale inhibitrice (Tatsumi et al., 2018). Olig2 est par ailleurs impliqué dans la prolifération des astrocytes réactifs et joue un rôle critique dans la gliogenèse post-lésion (Buffo et al., 2005; Cassiani-Ingoni et al., 2006; Magnus et al., 2007; Chen et al., 2008). Chen et ses collègues suggèrent que les astrocytes réactifs reviennent à une forme immature de précurseur après une lésion corticale et que l'expression d'Olig2 leur permet de ré-entrer dans le cycle cellulaire et de proliférer, ce qui appuierait l'idée qu'Olig2 est un marqueur d'astrocytes immatures. Au regard de ces différentes études, la question d'Olig2 comme marqueur de sous-populations astrocytaires reste en suspens, en particulier dans la substance grise et même plus spécifiquement dans le cortex cérébral (la plupart des études publiées jusqu'à présent ayant été conduites dans la substance blanche, ou encore dans la moelle épinière), et sera abordée aux cours de ces travaux de thèse.

Il faut signaler qu'aucun des marqueurs cytoplasmiques présentés ci-dessus ne permet d'observer la morphologie complète des astrocytes, les fins prolongements n'étant pas marqués, rendant difficiles les interprétations de données basées sur la morphologie et les comparaisons entre régions du cerveau, voire entre espèces. L'utilisation de lignées de souris transgéniques où la Green Fluorescent Protein (GFP) est exprimée sous le contrôle de promoteurs spécifiques tels que GFAP-GFP (Zhuo et al., 1997; Nolte et al., 2001), Aldh1l1-GFP (Cahoy et al., 2008; Tsai et al., 2012; Chai et al., 2017) ou encore S100 β -GFP (Zuo et al., 2004) offre la possibilité de s'affranchir de cet inconvénient, en marquant de manière efficace à la fois le corps cellulaire et l'arborisation des astrocytes. De plus ces lignées ne semblent pas restreintes à certains sous-types astrocytaires, contrairement aux immunomarqueurs abordés précédemment (Emsley and Macklis, 2006). Les lignées transgéniques utilisant ces mêmes promoteurs pour déclencher un marquage grâce aux systèmes de recombinaison Cre/Lox, ou CreER/Lox pour une recombinaison inducible, peuvent s'avérer précieuses pour étudier le développement des astrocytes et/ou effectuer des expériences gain ou perte de fonction. Ces fonctions sont très diverses chez les astrocytes et nombre d'entre elles ont déjà été décrites.

2.3. Hétérogénéité fonctionnelle

Si aucun marqueur spécifique des différents stades de développement des astrocytes n'est aujourd'hui disponible, ces derniers peuvent toutefois être classés selon trois grandes catégories : les progéniteurs de la glie radiaire, les astrocytes immatures et les astrocytes adultes (Molofsky et al., 2012).

Les cellules de la glie radiaire

Les cellules de la glie radiaire sont les cellules souches neurales du cerveau embryonnaire et néonatal, elles génèrent d'abord les neurones lors d'une phase neurogénique et leur servent de support le long duquel ils migrent radialement (Rakic, 1971, 1972, 2007; Rowitch and Kriegstein, 2010). Elles s'engagent ensuite dans une phase gliogénique avec la production d'astrocytes et d'oligodendrocytes. Ces différents aspects seront discutés plus longuement dans le paragraphe concernant le développement du cortex cérébral. Les cellules de la glie radiaire sont par ailleurs à l'origine des astrocytes de la zone sous ventriculaire postnatale générant des progéniteurs postnataux qui migrent le long du Rostral Migratory Stream (RMS) vers le bulbe olfactif où ils assurent le renouvellement des cellules

granulaires et des interneurons périglomérulaires. Les cellules issues des cellules de glie radiaire continuent également de générer des précurseurs d'interneurons chez l'adulte (Ventura and Goldman, 2007). Les cellules souches neurales adultes, situées notamment dans la zone sous ventriculaire, présentent des caractéristiques morphologiques et moléculaires des astrocytes matures : des faisceaux de filaments intermédiaires, des corps denses dans le cytoplasme, les jonctions gap et de multiples terminaisons (Peters et al., 1991). Considérées comme une sous-population d'astrocytes matures, elles génèrent chez l'adulte les neurones du bulbe olfactif (Doetsch et al., 1999; Ihrie and Alvarez-Buylla, 2008).

Les astrocytes immatures

À cause des difficultés d'identification des astrocytes immatures dues au manque de marqueurs moléculaires précoces, leur fonction n'a été étudiée que récemment. Ils contrôlent la formation, la fonction et l'élimination des synapses (Chung et al., 2015) pendant les phases critiques du développement du système nerveux reposant sur l'équilibre entre la stabilisation et l'élimination synaptique (Pfrieger, 2009). En effet, des études menées sur des neurones en culture avec ou sans astrocytes montrent que ces derniers régulent non seulement le nombre de synapses et participent activement à leur plasticité (Ullian et al., 2001) mais sont aussi indispensables à leur maturation fonctionnelle, même en l'absence de contact direct (Pfrieger and Barres, 1997). Cette régulation serait véhiculée par des molécules sécrétées du côté présynaptique : les thrombospondines. Ces glycoprotéines favorisent la synaptogenèse *in vivo* et *in vitro* et sont exprimées par les astrocytes immatures pendant une fenêtre développementale réduite proche de P5 qui coïncide avec l'initiation des contacts synaptiques entre dendrites et axones (Christopherson et al., 2005; Eroglu et al., 2009). Les thrombospondines sont aussi responsables de la croissance des neurites dans certains cadres développementaux et du bourgeonnement des axones après lésion (Arber and Caroni, 1995; Liauw et al., 2008). D'autres protéines sécrétées par les astrocytes, telles que hevin et SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine, des protéines de détachement de la matrice extracellulaire) voient leur expression atteindre un pic pendant la seconde et la troisième semaine de développement chez la souris (Kucukdereli et al., 2011), une période pendant laquelle l'activité synaptique dépendante de l'expérience contrôle la maturation de certaines synapses et conduit

à l'élimination des synapses les plus faibles (Luo and O'Leary, 2005). La régulation de la synaptogenèse et de la plasticité synaptique par les astrocytes pourrait également être liée aux intégrines, au cholestérol et aux éphrines du côté présynaptique (Pfrieger, 2009), et aux glypicans 4 et 6 via la sous-unité GluA1 du récepteur au glutamate AMPAR du côté postsynaptique (Allen et al., 2012). D'autres fonctions possibles des astrocytes immatures incluent le guidage de la migration neuronale à la fin de l'embryogenèse via la sécrétion de protéines de la matrice extracellulaire ou de molécules de signalisation, et la régulation de la croissance axonale et dendritique (Molofsky et al., 2012). Certaines études ont par ailleurs montré que des modifications de l'arborisation dendritique des neurones sont observées dans un modèle de co-culture avec des astrocytes présentant des défauts génétiques liés aux syndromes de Rett et de l'X fragile (troubles neurodéveloppementaux avec déficiences mentale et comportementale) (Ballas et al., 2009; Jacobs and Doering, 2010).

Les astrocytes matures

Les fonctions des astrocytes adultes sont aujourd'hui les mieux connues. En contact à la fois avec les neurones et les vaisseaux sanguins, ils fournissent aux neurones support structurel et nutriments. Ils jouent un rôle dans de nombreux aspects du contrôle la transmission et de la plasticité synaptiques en maintenant leur homéostasie extracellulaire (Haydon and Parpura, 2009; Molofsky et al., 2012). La morphologie extrêmement ramifiée des astrocytes leur donne un accès privilégié aux synapses où ils sont activement impliqués dans la transmission du signal (réponses et instructions) dans le système nerveux (Cornell-Bell et al., 1990; Halassa and Haydon, 2010). En modulant l'excitation et l'inhibition neurales, notamment en recyclant et libérant le glutamate, la D-sérine et l'ATP, ainsi que la transmission synaptique, les astrocytes ont une influence sur le traitement de l'information, le sommeil, l'apprentissage et la mémoire (Araque et al., 1999; Volterra and Meldolesi, 2005; Araque et al., 2014) : les astrocytes répondent à l'activité neuronale avec une élévation de la concentration intracellulaire en ions calciques (Ca^{2+}), déclenchant la libération de gliotransmetteurs, qui eux-mêmes entraînent une régulation de l'activité synaptique et neuronale (Di Castro et al., 2011; Panatier et al., 2011; Tasker et al., 2012). Ces découvertes doivent être prises avec prudence cependant, les libérations du glutamate et de gliotransmetteurs par les astrocytes étant encore aujourd'hui

controversées (Barres, 2008; Agulhon et al., 2010; Hamilton and Attwell, 2010). Ainsi selon le concept de la synapse tripartite qui a émergé en 1999, les neurones ne sont pas les seuls impliqués dans la transmission synaptique et les astrocytes et les cellules de Schwann pérисynaptiques (assurant la myélinisation des axones dans le système nerveux périphérique) viennent également s'ajouter aux éléments pré- et post-synaptiques neuronaux (Araque et al., 1999; Perea et al., 2009).

Les astrocytes, avec les péricytes et les cellules endothéliales sont aussi des composants cruciaux de la barrière hémato-encéphalique, régulant le passage de molécules, ions et cellules du système sanguin vers le parenchyme. Ils sont notamment importants pour le contrôle du débit sanguin et de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (Takano et al., 2006; Attwell et al., 2010). Ils ont également des fonctions importantes dans le bon fonctionnement du système immunitaire cérébral. Ils répondent aux lésions et pathologies par un procédé appelé astrogliose réactive (Sofroniew and Vinters, 2010) lors de laquelle ils s'hypertrophient (Wilhelmsson et al., 2006), surexpriment la GFAP (Eng and Ghirnikar, 1994) ou ré-expriment des marqueurs précoces tels que la vimentine et la nestine (Sofroniew, 2005), et prolifèrent afin de réparer un tissu blessé, limiter l'inflammation et la mort des neurones en formant une cicatrice gliale (Sofroniew, 2005; Okada et al., 2006; Buffo et al., 2008; Anderson et al., 2014). Les astrocytes favorisent par ailleurs la survie neuronale dans des contextes neuroinflammatoires et hypoxiques (Saijo et al., 2009; Vangeison and Rempe, 2009; Allaman et al., 2011). Comme c'est le cas en contexte physiologique, les astrocytes réactifs présentent une certaine hétérogénéité à plusieurs niveaux : fonctionnel moléculaire, morphologique, topographique et suivant les régions du cerveau (Anderson et al., 2014).

Certains sous-types morphologiques d'astrocytes ont des fonctions distinctes, comme les astrocytes de la surface piale qui font partie de la glia limitans, une couche protectrice au contact des méninges, formée par les prolongements astrocytaires et isolant le système nerveux central en séparant le fluide cérébrospinal (ou céphalorachidien) de l'espace extravasculaire (Wolburg et al., 2009). Les glies de Bergmann et de Müller trouvées dans le cervelet et la rétine respectivement, auraient également des fonctions spécifiques de ces régions notamment dans le guidage de la migration cellulaire durant le développement (Reichenbach et al., 2010; Farmer and Murai, 2017). Les fonctions d'autres sous-types sont encore mal connues,

notamment celles des astrocytes de type fibreux. On sait toutefois que ces cellules sont apposées aux vaisseaux sanguins via leurs ramifications de la même manière que les astrocytes protoplasmiques (Marín-padilla, 1995). Certaines études *in vitro* suggèrent que les astrocytes pourraient avoir un rôle dans la myélinisation, et notamment lors de son initiation, en favorisant l'adhésion des prolongements oligodendrocytaires aux axones (Meyer-Franke et al., 1999). Ils augmentent aussi le taux d'enveloppement de myéline dans des co-cultures de neurones et d'oligodendrocytes (Watkins et al., 2008). Cette implication dans la myélinisation donne peut-être des pistes sur les rôles des astrocytes fibreux de la substance blanche où, par définition, la densité d'axones et d'oligodendrocytes est grande.

Ainsi les astrocytes ont des fonctions très variées dans le système immunitaire, les connexions et la survie des neurones, la neurogenèse adulte, l'établissement et le maintien de la barrière hématoencéphalique ainsi que dans le contrôle du débit sanguin. Ils expriment de nombreux marqueurs moléculaires différents et présentent des morphologies diverses qui peuvent dépendre de leur état, développemental ou réactif, mais aussi de leur localisation dans le cerveau. Cette variabilité se retrouve également à l'échelle des espèces.

2.4. Hétérogénéité inter-espèces

Le domaine des cellules gliales manque cruellement d'études évolutives comparées. Cependant, il a été établi que chez la *Drosophile*, où à la fois les neurones et la glie dérivent des neuroblastes, la production de cellules gliales et l'inhibition du lignage neuronal sont contrôlées par le facteur de transcription *gcm* (glial cells missing) dans les systèmes nerveux central et périphérique (Hosoya et al., 1995; Jones et al., 1995; Chaboub and Deneen, 2012). Si des homologues de *gcm* chez l'Homme ont été identifiés (Kammerer et al., 1999; Kanemura et al., 1999; Nait-Oumesmar et al., 2000), l'expression de *gcm* dans le tissu nerveux des vertébrés n'est pas conservée, contrairement à celle de nombreux gènes de différenciation exprimés dans les neurones incluant canaux ioniques, protéines de vésicules synaptiques, molécules d'adhésion et enzymes synthétisant des neurotransmetteurs (Kim et al., 1998; Chaboub and Deneen, 2012). La manipulation des homologues de *gcm* chez la souris n'affecte pas la génération d'astrocytes ou d'oligodendrocytes. Par ailleurs, contrairement à l'Homme (Eng et al., 1971; Dahl and Bignami, 1973), au

poisson zèbre (Cuoghi and Mola, 2009) et au poulet (Roeling and Feirabend, 1988) la GFAP n'a pas d'homologue chez la Drosophile.

Au sein même du taxon des mammifères une grande variabilité en termes de taille, structure, complexité et diversité des astrocytes est observée (Nedergaard et al., 2003; Oberheim et al., 2006, 2009, 2012). La complexité de leurs ramifications va croissante de la souris à l'Homme en passant par le chimpanzé et le macaque rhésus avec une augmentation des terminaisons GFAP+ (Oberheim et al., 2009), bien que la densité synaptique reste stable (DeFelipe et al., 2003). Ainsi des marquages GFAP ou Dil montrent que les astrocytes corticaux humains sont organisés en domaines comme ceux des rongeurs, mais qu'ils ont en revanche un diamètre 2.6 fois plus grand (Figure 5a). Cette évolution morphologique chez les vertébrés était déjà observée par Ramón y Cajal qui compara la morphologie des astrocytes humains et d'autres mammifères (Ramón y Cajal, 1909). Chez l'Homme, des sous-classes morphologiques d'astrocytes corticaux, non représentées chez les rongeurs, apparaissent (Figure 5b) : les astrocytes interlaminaires de la couche I, GFAP+/CD44+ (une protéine de la membrane plasmique et récepteur de la matrice extracellulaire) (Colombo and Reisin, 2004), déjà décrits par Andriezen et Retzius (Andriezen, 1893; Retzius, 1894), les astrocytes protoplasmiques des couches II/III, GFAP- ; les astrocytes des couches V et VI projetant des varicosités ; et les astrocytes fibreux de la substance blanche, GFAP+/CD44+ (Oberheim et al., 2009; Sosunov et al., 2014). Les astrocytes humains propagent par ailleurs les ondes Ca^{2+} quatre fois plus vite que ceux des rongeurs (Oberheim et al., 2009), et, lorsque des cellules progénitrices gliales humaines sont greffées à la naissance chez la souris, ces cellules leur accordent un avantage compétitif par rapport aux cellules hôtes (Windrem et al., 2014). Les astrocytes générés par les cellules gliales humaines, qui présentent une taille et une complexité supérieures à celles des astrocytes murins, forment des jonctions communicantes avec les astrocytes hôtes et remplacent progressivement ces derniers. Ces greffes améliorent même la plasticité synaptique et l'apprentissage (Han et al., 2013). Ces différents résultats fonctionnels font des astrocytes humains une catégorie unique différant de ceux des rongeurs à la fois morphologiquement et fonctionnellement. A ces hétérogénéités morphologique, moléculaire et inter-espèces s'ajoutent des particularités liées à la localisation des astrocytes dans le cerveau.

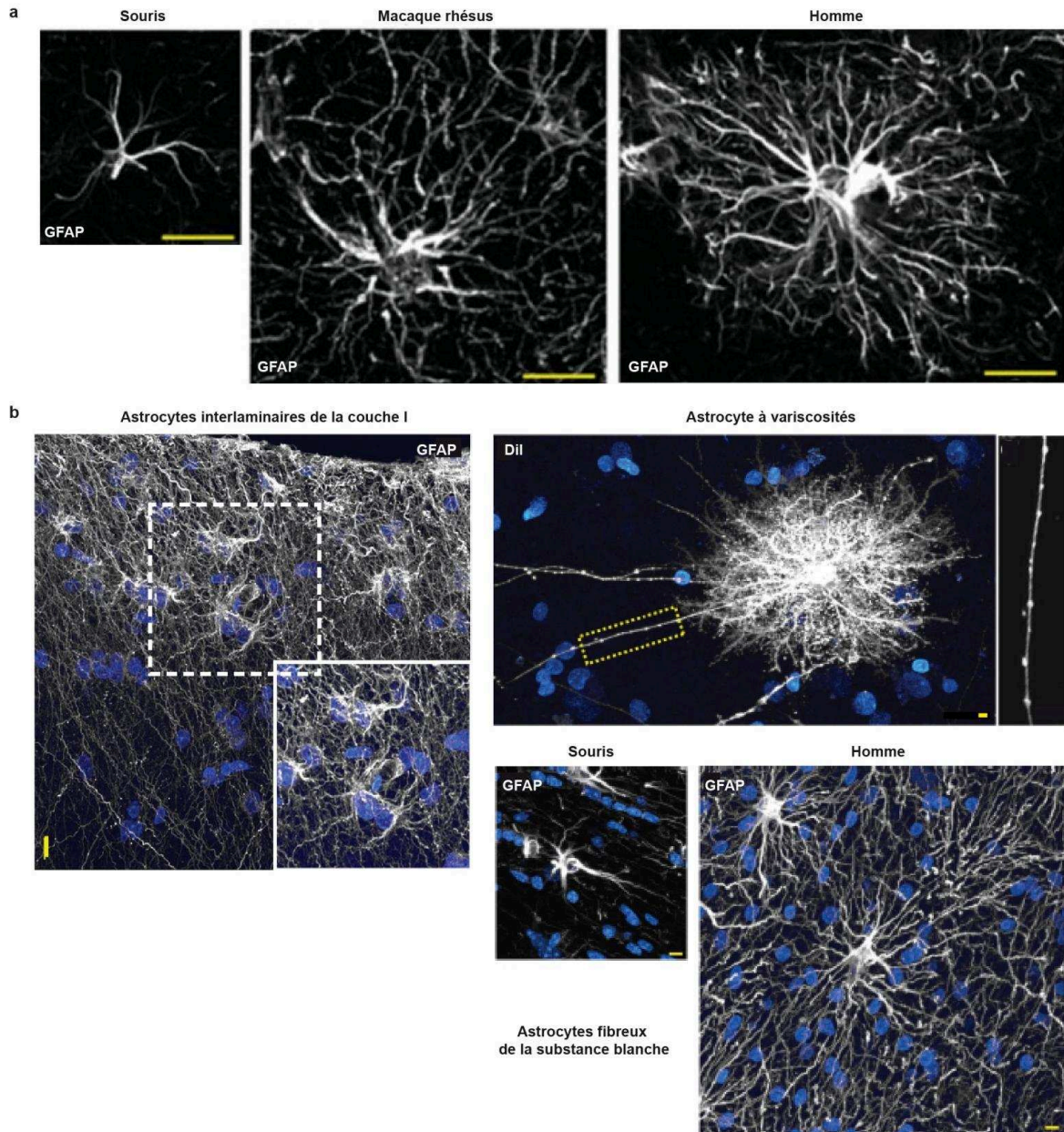


Figure 5. Caractéristiques spécifiques des astrocytes humains.

(a) Les astrocytes humains sont plus grands et plus complexes que ceux des rongeurs et des autres primates. Les astrocytes murins, du macaque rhesus et humains sont comparés par immunomarquage GFAP. (b) Sous-classes morphologiques d'astrocytes corticaux humains : astrocytes interlaminaires de la couche I, astrocytes à varicosités et astrocytes fibreux de la substance blanche.

Barres d'échelles : a : 20 μm ; b : 5 μm . (d'après Oberheim et al., 2012 et Oberheim et al., 2009)

2.5. Hétérogénéité inter-régionale

Les souris transgéniques GFAP-GFP permettent d'observer la diversité morphologique et régionale déjà mise en évidence par Cajal et Retzius (Retzius, 1894; Ramón y Cajal, 1909) mais révèlent aussi d'autres sous-types gliaux régionaux (Figure 6) (Emsley and Macklis, 2006) différents des astrocytes protoplasmiques, fibreux, et des glios de Bergmann et Müller : les tanocytes, les cellules "radiales" ainsi que les glios de type "velate", marginale, périvasculaire et épendymaire. Les tanocytes sont spécifiques des zones périventriculaires, les astrocytes "velate" sont présents dans le cervelet et les bulbes olfactifs où ils enveloppent les neurones granulaires et les épendymocytes sont situés le long des ventricules.

Certaines régions définies par des types neuronaux particuliers sont également caractérisées par la présence d'un ou plusieurs sous-types d'astrocytes ayant une densité particulière en fonction des zones (Emsley and Macklis, 2006) (Figure 7). La morphologie des astrocytes peut donc être déterminée par la cytoarchitecture d'une région cérébrale donnée (Matyash and Kettenmann, 2010) : les cellules de la glie de Bergmann ont leur soma dans la couche des cellules de Purkinje et envoient de nombreux prolongements vers la couche moléculaire du cervelet pour finir au niveau de la surface piaie. La glie de Müller, également polarisée radialement, est rattachée à la surface interne de la rétine, formant un réseau de cellules parallèles couvrant toutes les couches rétinienne (Derouiche et al., 2012). Les ramifications des astrocytes de la substance blanche sont quant à elles orientées le long des fibres nerveuses (Farmer and Murai, 2017) tandis que dans la couche moléculaire du gyrus denté de l'hippocampe, la distribution des astrocytes protoplasmiques, dont la morphologie est par ailleurs polarisée dans cette région, est liée à la limite séparant les afférences commissurales et perforantes (Bushong et al., 2003). Ces zones cérébrales pourraient de fait être définies par la morphologie des astrocytes qui les occupent, mais également leur densité (pouvant varier d'un marqueur à l'autre et d'un facteur 100 selon les régions, de très basse dans le noyau accumbens à très haute dans la zone sous-épendymaire,) et le taux de prolifération des astrocytes, redéfinissant de manière indépendante la cytoarchitecture du système nerveux central adulte basée jusqu'ici essentiellement

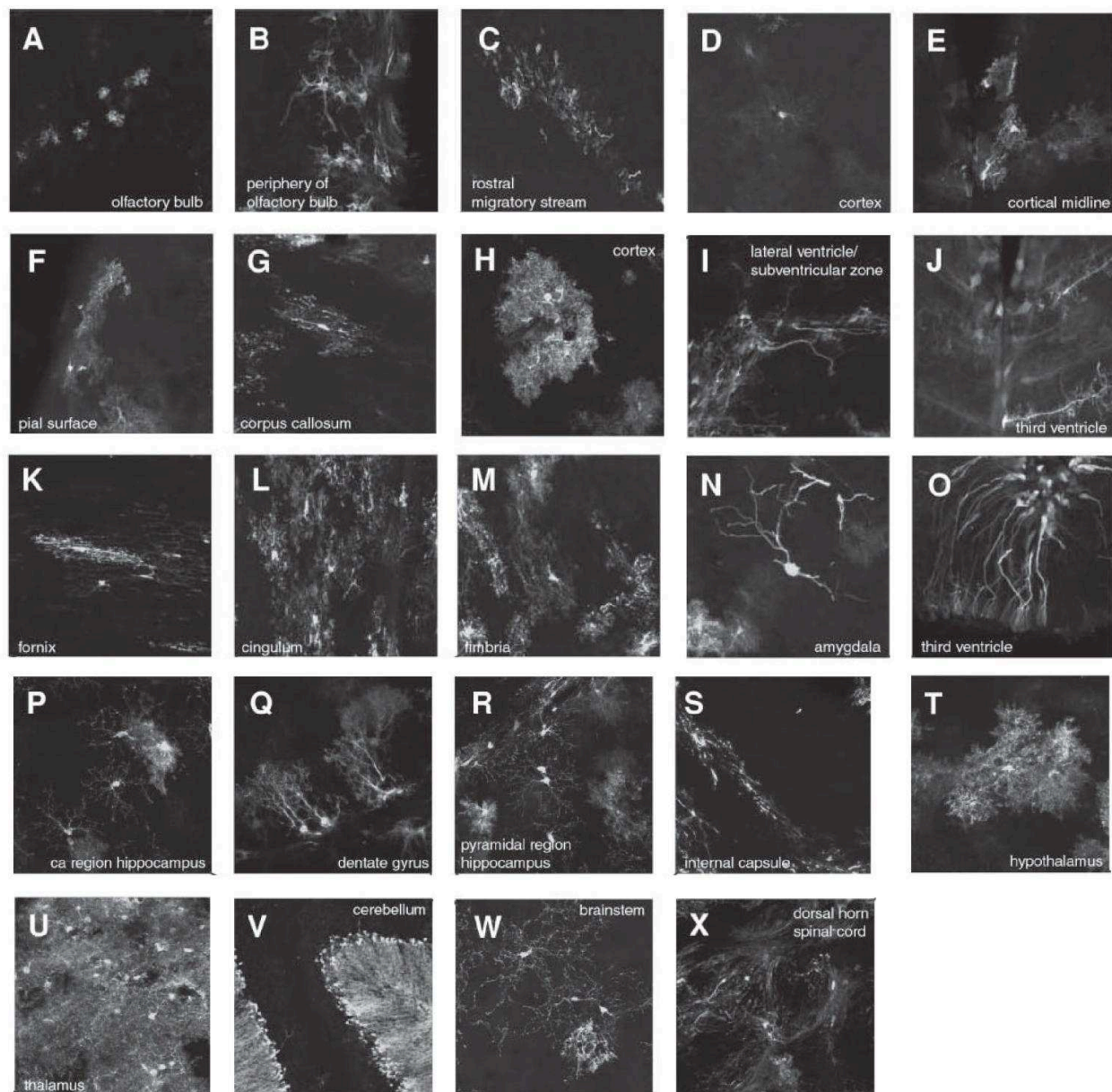


Figure 6. Diversité des morphologies astrocytaires au sein du système nerveux central.

(A-X) Images représentatives d'astrocytes observés dans des régions sélectionnées du système nerveux central d'une souris adulte *hGFAP-GFP* (axe antéropostérieur). Projections maximales d'images confocales. (d'après *Emsley et Macklis, 2006*)

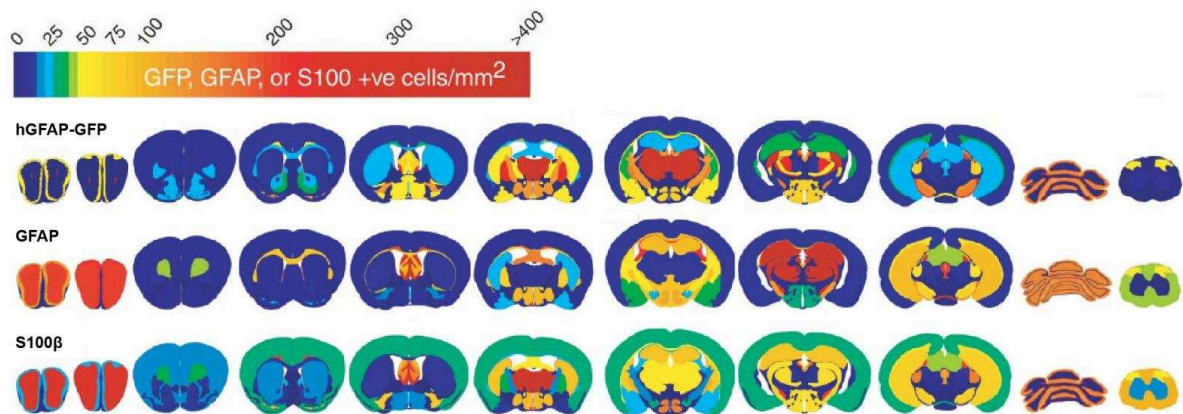


Figure 7. Densité astrocytaire obtenue avec trois méthodes de marquage.

Atlas schématique de la densité astrocytaire sur l'axe antéropostérieur dans les différentes régions cérébrales. La densité astrocytaire est extrêmement variable selon les régions, mais également selon le marqueur utilisé (cellules GFP+ dans la souris transgénique *hGFAP-GFP*, immunomarquage GFAP ou S100β). (d'après *Emsley and Macklis, 2006*)

sur les neurones et permettant de mieux appréhender les interactions neurones-glie (Emsley and Macklis, 2006).

A la diversité essentiellement morphologique viennent s'ajouter des différences fonctionnelles entre astrocytes de régions cérébrales diverses qui viennent s'adapter aux réseaux neuronaux environnants (Farmer and Murai, 2017). La glie de Müller a des fonctions adaptées à celles de la rétine comme le transport fluide et la protection contre le stress oxydatif pendant la photoréception (Reichenbach and Bringmann, 2013) mais agit également comme des fibres optiques (Franze et al., 2007). La glie de Bergmann exprime des hauts niveaux de protéines adaptées à l'innervation glutamatergique intense de la couche moléculaire du cervelet, tels que des transporteurs et des récepteurs du glutamate (Saab et al., 2012). Les astrocytes du tronc cérébral ventral, impliqué dans la respiration, sont sensibles aux changements de pH sanguin et répondent à des taux élevés de CO₂ en libérant de l'ATP (Gourine et al., 2010). Les astrocytes du noyau arqué hypothalamique, impliqué dans la régulation de la faim et de la soif, répondent à de nombreuses hormones pour moduler l'activité neuronale, réguler l'absorption de glucose et la consommation de nourriture (Kim et al., 2014; Fuente-Martín et al., 2016; García-Cáceres et al., 2016). Les astrocytes du noyau suprachiasmatique dorsal, régulateur principal du rythme circadien, jouent un rôle dans la régulation de la durée du cycle circadien (Brancaccio et al., 2017; Ruben and Hogenesch, 2017). Ainsi les fonctions astrocytaires sont intimement liées à celles des régions qu'ils occupent et des neurones qui les entourent.

2.6. Hétérogénéité intra-régionale

Dans la moelle épinière, les astrocytes situés dans des domaines régionaux particuliers acquièrent des caractéristiques distinctes, se spécialisent pour interagir avec les neurones environnants (Hochstim et al., 2008; Tsai et al., 2012) et expriment des signaux spécifiques indispensables à la formation des circuits neuraux (Molofsky et al., 2014). Ces sous-types d'astrocytes fibreux peuvent être distingués d'après leur expression combinée des protéines reeline et slit1 (impliquées dans le guidage axonal) et leurs identités locales peuvent être définies par l'expression des facteurs de transcription à homéodomaines Pax6 et Nkx6.1 (Hochstim et al., 2008). La spécialisation intra-régionale des astrocytes semble être généralisée au système nerveux central et est source de limitations dans la réponse des astrocytes aux

lésions qui surviennent dans des régions voisines (Tsai et al., 2012). Les astrocytes pourraient être considérés comme des référentiels stables de l'information, nécessaires au bon fonctionnement de régulations locales des fonctions cérébrales.

La diversité fonctionnelle et moléculaire des astrocytes corticaux a été largement moins étudiée que celle des astrocytes de la moelle épinière. Si les astrocytes fibreux et protoplasmiques ont souvent été comparés (Miller and Raff, 1984; Tabata, 2015), les études caractérisant les propriétés spécifiques des sous-types astrocytaires dans les différentes couches corticales manquent. On peut tout de même noter les morphologies variées retrouvées dans le cortex cérébral (Figure 8), allant des astrocytes de la surface piaie, d'apparence fibreuse, aux astrocytes protoplasmiques périvasculaires entourant les vaisseaux sanguins, en passant par les astrocytes protoplasmiques et les astrocytes de morphologies intermédiaires. Si fonctionnellement, les astrocytes de la couche I présentent une activité calcique différente de celle des astrocytes des couches II/III (Takata and Hirase, 2008), la question de l'hétérogénéité des astrocytes corticaux et son lien avec les spécificités des couches neuronales mérite d'être approfondie.

L'inventaire des nombreuses fonctions des astrocytes, au cours du développement ou après leur maturation semble montrer qu'elles sont intimement liées à celles des neurones. À cette hétérogénéité fonctionnelle s'ajoute une hétérogénéité morphologique, inter- et intra-régionale. La question de l'origine de ces hétérogénéités et de leur contribution au fonctionnement du système nerveux central en fonction des régions cérébrales se pose. Pour approfondir ce point, il faut revenir sur le développement du système nerveux central et en particulier du cortex cérébral, structure d'intérêt de ces travaux.

3. Le développement du cortex cérébral murin

Après la fécondation, le zygote effectue une série de divisions cellulaires rapides constituant la phase de segmentation, avant de subir des réorganisations cellulaires importantes (Figure 9a). Le blastocœle ainsi formé va s'invaginer durant la gastrulation pour former les trois feuillets embryonnaires : l'endoderme, l'ectoderme et le mésoderme (Figure 9b). Un plan de symétrie est défini. Caractéristique des bilatériens, l'embryon va se développer selon cet axe. Le foie, les poumons et les

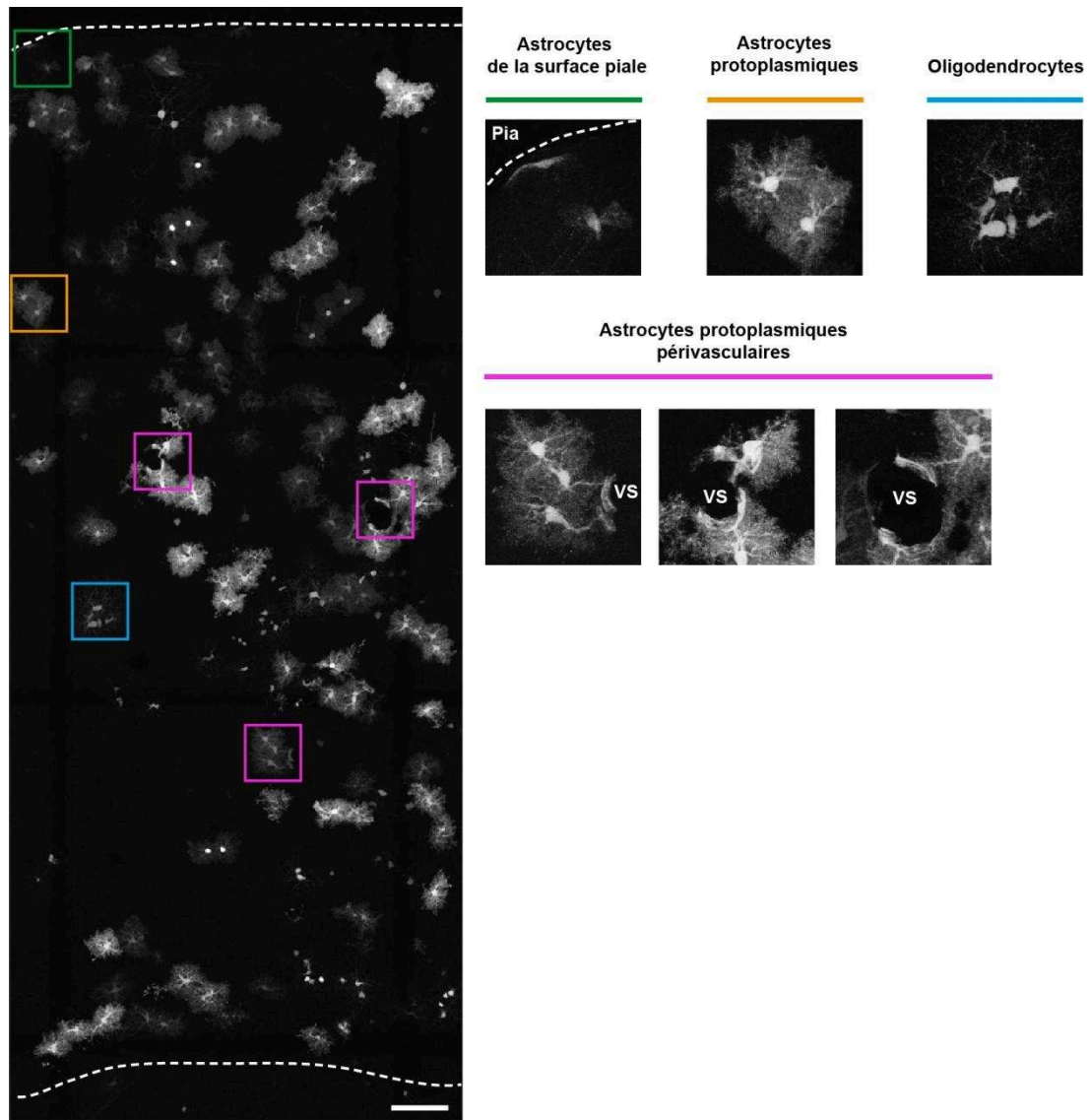


Figure 8. Morphologies gliales dans le cortex cérébral murin.

Morphologies gliales variées retrouvées dans le cortex cérébral murin à P21: astrocytes de la surface piaie, d'apparence fibreuse, astrocytes protoplasmiques, astrocytes protoplasmiques périvasculaires, entourant les vaisseaux sanguins (VS), et oligodendrocytes (fluorescence endogène obtenue par électroporation *in utero* de plasmides codant des protéines fluorescentes).

Image personnelle. Projection maximale d'une coupe sagittale de 80 μm . Barre d'échelle : 100 μm .

intestins seront formés à partir de l'endoderme, les reins, les os, les muscles, les organes reproducteurs et le système vasculaire à partir du mésoderme. L'ectoderme sera quant à lui à l'origine de l'épiderme et des systèmes nerveux central et périphérique.

3.1. Le développement du système nerveux

Durant la neurulation, la plaque neurale, constituée d'une couche de cellules de l'ectoderme va se refermer en gouttière pour former le tube neural, à l'origine de l'encéphale et de la moelle épinière. Les cellules dorsales délaminent du tube neural et forment la crête neurale via une transition épithélio-mésenchymateuse, à l'origine du système nerveux périphérique (Figure 9c). Le tube neural se divise ensuite en trois puis cinq vésicules : le prosencéphale, donnant le télencéphale et le diencephale (rétine, thalamus, épithalamus, hypothalamus), le mésencéphale, et le rhombocéphale, donnant le métencéphale (cervelet, pont) et le myélocéphale (Figure 9d). Du côté rostral, le télencéphale bourgeonne une première fois pour former les deux vésicules télencéphaliques d'où seront issus les deux hémisphères cérébraux, et donc le cortex cérébral, puis une seconde fois pour donner naissance aux structures olfactives. Des cavités sont formées à l'intérieur du télencéphale et du diencephale : les ventricules cérébraux, à l'intérieur desquels les plexus choroïdes sécrètent le liquide céphalo-rachidien (Figure 9e). Au sein des vésicules télencéphaliques, les parois dorsales des ventricules latéraux abritent les cellules progénitrices du futur cortex cérébral.

3.2. Les premières étapes du développement cortical

Le développement du cortex cérébral débute vers E9-E10 chez la souris et s'articule en différentes étapes cruciales : la prolifération des cellules progénitrices, la différenciation et la migration de leurs cellules filles. Au cours du développement embryonnaire, les cellules neuroépithéliales constituant un neuroépithélium pseudo-stratifié d'origine ectodermique et bordant les ventricules cérébraux se divisent symétriquement pour accroître leur population (Laguesse et al., 2015) (Figure 10a) et acquièrent progressivement des caractéristiques gliales de manière hétérogène (microtubules, protéines de filaments intermédiaires, granules de stockage de glycogène, transporteurs au glutamate GLAST et BLBP (Dahl and Bignami, 1973;

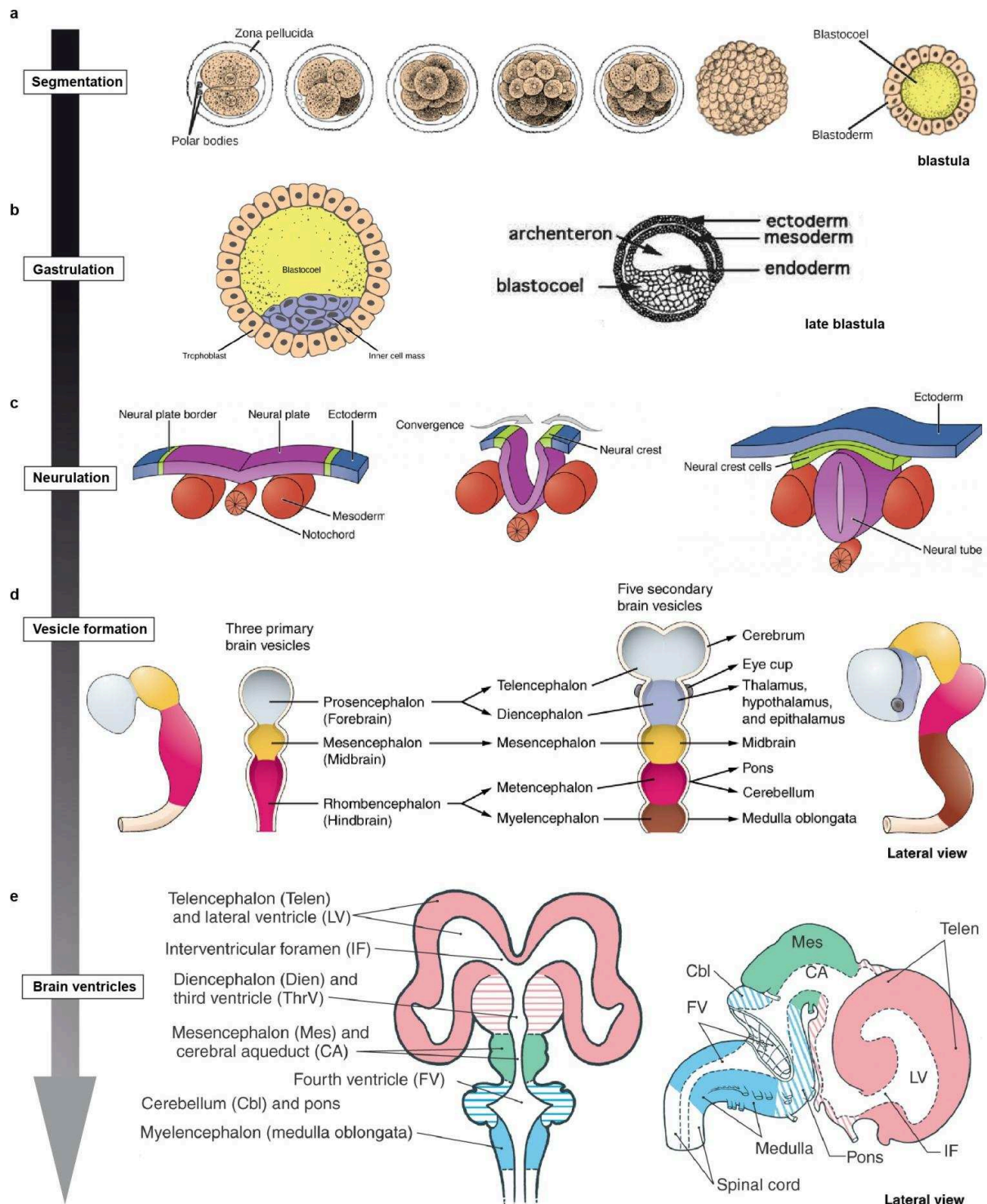


Figure 9. Développement du système nerveux central.

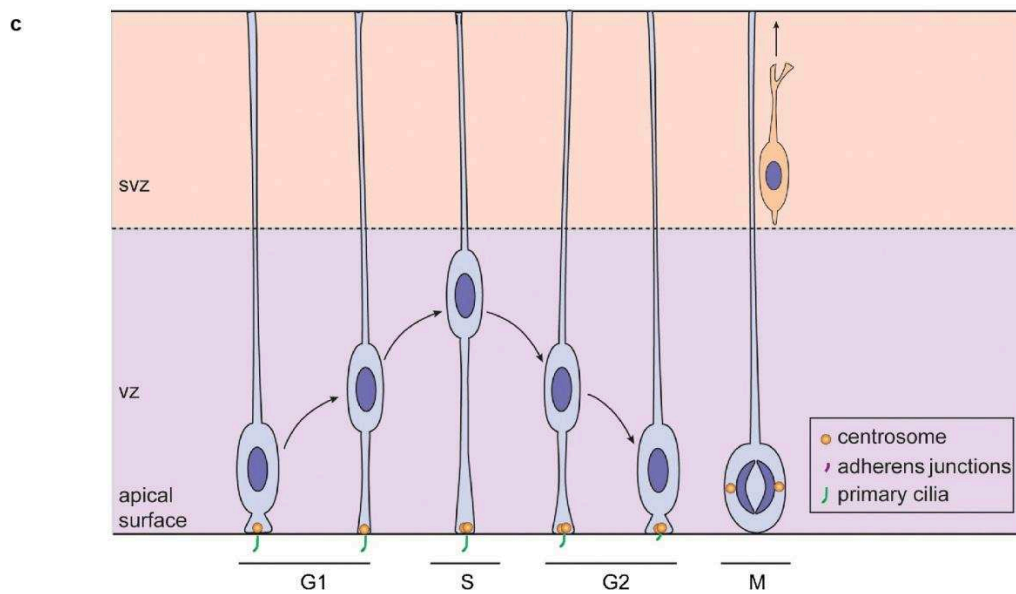
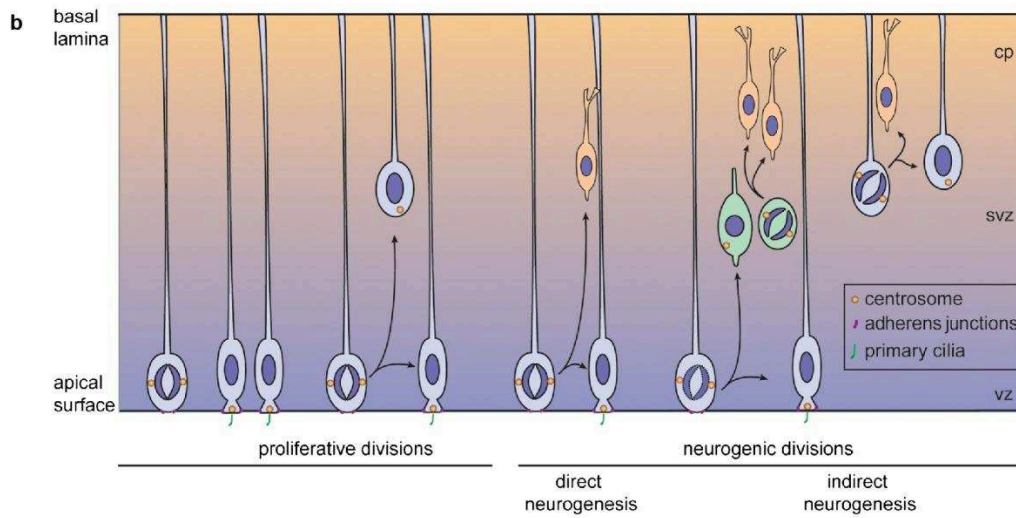
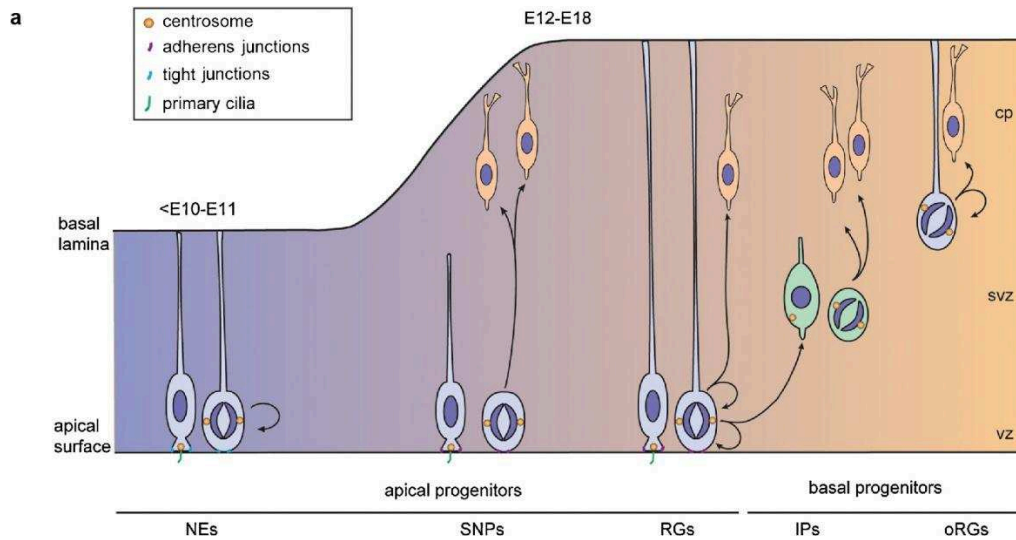
(a) Pendant la segmentation, le zygote se divise rapidement en de multiples cellules sans augmentation de taille. Un réarrangement cellulaire permet la formation d'une cavité : le blastocoêle. (b) Durant la gastrulation, les cellules du blastocyste se réarrangent pour former trois feuilletts : l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme. (c) La région centrale de l'ectoderme forme le tube neural donnant naissance au cerveau et à la moelle épinière pendant la neurulation : les tissus neuroectodermiques se différencient à partir de l'ectoderme et s'épaississent pour former la plaque neurale puis celle-ci se replie dorsalement pour se refermer et former le tube neural. (d) Formation des cinq vésicules céphaliques à partir des trois vésicules primaires. (e) Développement embryonnaire du cerveau et du système ventriculaire en vues dorsale et latérale. *Images OpenStax*

Levitt and Rakic, 1980; Brückner and Biesold, 1981; Choi, 1981; Onteniente et al., 1983; Pixley and de Vellis, 1984; Feng et al., 1994; Shibata et al., 1997; Hartfuss et al., 2001; Campbell and Götz, 2002) : pour devenir des cellules de la glie radiaire (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009) (Figure 10b). Bipolaires, ces cellules restent en contact à la fois avec la paroi ventriculaire par leur prolongement apical et avec la surface piaie par leur prolongement basal, mais conservent leur corps cellulaire dans la zone ventriculaire, à proximité des ventricules (Angevine et al., 1970). Les cellules de la glie radiaire ont un comportement mitotique complexe appelé migration nucléaire interkinétique. Lors de ce processus, où l'orientation du fuseau mitotique est cruciale pour conserver l'ancrage apical des cellules de la glie radiaire (Konno et al., 2008), le noyau des cellules effectue un mouvement radial de va-et-vient sur toute l'épaisseur de la zone ventriculaire en harmonie avec les différentes phases du cycle cellulaire (Sauer, 1935; Miyata, 2007; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Laguesse et al., 2015) (Figure 10c). Ainsi, pendant le cycle cellulaire, les noyaux oscillent entre la surface du ventricule (où elles se trouvent en phase M, phase de division) et la limite basale de la zone ventriculaire située à plusieurs dizaines de micromètres du ventricule (en phase S, phase de réplication de l'ADN), avec un positionnement intermédiaire entre les deux (en phases G1 et G2, phases de croissance).

Au cours de l'épaississement du cortex cérébral pendant la phase de neurogenèse (E11-E16), les prolongements de ces cellules s'allongent et les pieds apicaux restent ancrés les uns aux autres par des jonctions adhérentes,

Figure 10. Du neuroépithélium aux cellules de la glie radiaire: initiation du développement cortical.

(a) Les cellules neuroépithéliales (NEs) forment l'épithélium du tube neural (<E11) et se divisent symétriquement pour s'auto-renouveler et étendre la surface du tube neural. Puis les NEs se transforment progressivement en progéniteurs apicaux : les cellules de la glie radiaire (RGs) et les précurseurs neuraux à court prolongements basaux (SNPs). Au début de la neurogenèse, la plupart des RGs se divisent asymétriquement pour produire des RGs et des neurones de manière directe, ou via des progéniteurs basaux : les progéniteurs intermédiaires (IPs) et les cellules de la glie radiaire externe (oRGs) chez l'Homme. (b) Orientation du fuseau mitotique dans l'acquisition de l'identité cellulaire. Les divisions planaires et verticales peuvent conduire à des divisions symétriques prolifératives ou asymétriques neurogéniques. Les divisions planaires donneraient préférentiellement deux RGs durant les divisions prolifératives et favoriseraient la neurogenèse directe pendant la phase neurogenique. (c) Migration nucléaire interkinétique des cellules de la glie radiaire : Le noyau se déplace entre les parties basale et apicale de la zone ventriculaire pendant les différentes phases du cycle cellulaire. (d'après Laguesse et al., 2015)



(légende sur la page précédente)

indispensable au maintien de l'intégrité de la zone ventriculaire. Au sein de cette dernière, les cellules de la glie radiaire prolifèrent d'abord symétriquement pour générer d'autres cellules progénitrices puis asymétriquement pour donner naissance à des neuroblastes qui migreront radialement en direction de la surface piaie pour coloniser la plaque corticale et former les 6 couches corticales, avec les neurones plus jeunes migrant au delà des neurones précédemment générés (Imai et al., 2006; Kuo et al., 2006; Rašin et al., 2007).

3.3. La phase neurogénique du développement cortical et la formation des différentes couches corticales

3.3.1. La génération des neurones corticaux

Longtemps considérées comme progéniteurs gliaux seulement, les cellules de la glie radiaire génèrent également les neurones pyramidaux du cortex cérébral. Pendant la phase neurogénique qui débute au stade E11 chez la souris, les cellules de la glie radiaire conservent leur polarité apico-basale et vont produire par divisions asymétriques une cellule de la glie radiaire, qui assure le renouvellement du pool de cellules progénitrices, et une autre cellule fille, neurone différencié ou progéniteur intermédiaire (Haubensak et al., 2004; Tamamaki et al., 2001; Noctor et al., 2001, 2004, 2007; Götz et al., 2002; Malatesta et al., 2000). Par la suite, les neurones sont produits principalement par des divisions terminales symétriques à partir de la zone sous ventriculaire où ont migré les progéniteurs intermédiaires (Noctor et al., 2004). Les contacts basaux des cellules de la glie radiaire avec les méninges, générées à partir d'E9-10 à partir de la crête neurale diencephalique (Couly and Le Douarin, 1987) et la signalisation acide rétinoïque sont essentiels lors de la transition entre la prolifération neuroépithéliale symétrique et la prolifération neurogénique asymétrique (Siegenthaler et al., 2009; Siegenthaler and Pleasure, 2011). Les prolongements radiaux sont maintenus en place pendant la mitose (Götz et al., 2002), mais leur héritage par les progéniteurs ou les neurones est asymétrique (Miyata et al., 2001). La cellule fille se différenciant en neurone perd son contact avec la surface apicale puis raccourcit son prolongement radial basal pour se diriger vers la surface piaie. Pendant la migration neuronale, les neurones pyramidaux, apposés aux prolongements de la glie radiaire se déplacent radialement (Hatten, 1999; Rakic, 1972). Pendant que le groupe de cellules de la glie radiaire mitotiquement inactif soutient la migration neuronale, le groupe mitotiquement actif augmente le nombre

de cellules de la glie radiaire nécessaires au guidage d'un nombre croissant de neurones nouvellement générés (Götz et al., 2002). L'ensemble de ces neurones va progressivement se différencier en neurones pyramidaux et former les différentes couches du cortex cérébral.

3.3.2. La formation des six couches corticales

Grâce aux observations de His notant l'absence de figures mitotiques mais la présence de cellules bipolaires orientées radialement dans la plaque corticale (His, 1874, 1904), il a été admis très tôt que les neurones générés au niveau de la zone ventriculaire acquièrent leur position finale après un long processus de migration radiale. Ces hypothèses ont été validées par les travaux de Rakic (Rakic, 1968; Rakic and Sidman, 1968; Angevine et al., 1970), et complétées avec le modèle neurogénique "inside out" (de l'intérieur vers l'extérieur) : les neurones générés les plus tardivement se retrouvent dans les couches supérieures (Angevine and Sidman, 1961; Rakic, 1974; Tan and Shi, 2013) (Figure 11a) et la perturbation de ce schéma cortical entraîne des défauts fonctionnels (Caviness and Rakic, 1978).

Au début de la neurogenèse, le néocortex est constitué de deux couches : la zone ventriculaire, proliférative, et la pré-plaque, en superficie, dérivant de la première vague neuronale (Rickmann and Wolff, 1981). Par la suite, plusieurs vagues de neurones postmitotiques quittent la zone ventriculaire et migrent radialement vers la surface piale, séparant la pré-plaque en zone marginale au-dessus et la sous-plaque, au dessous, établissant une nouvelle zone : la plaque corticale (Figure 11a). De nouvelles vagues de neurones migrent depuis la zone proliférative vers la plaque corticale entre E14 et E18, le long de la glie radiaire d'une part, mais aussi via un processus de "somal translocation" pour les neurones les plus précoces qui vont s'accrocher à la surface piale et transporter leur soma vers la surface piale par nucléokinèse (Nadarajah and Parnavelas, 2002; Tsai and Gleeson, 2005). A partir d'E12,5, ces neurones pyramidaux excitateurs sont rejoints progressivement par des neurones inhibiteurs GABAergiques (Figure 11b), qui effectuent une longue migration tangentielle à partir des zones prolifératives des éminences ganglionnaires latérales et médianes (LGE et MGE) où ils sont générés (Anderson et al., 1997, 2014; Valcanis and Tan, 2003) et terminent leur colonisation du néocortex par un mouvement radial, pour former avec les neurones pyramidaux les six couches corticales.

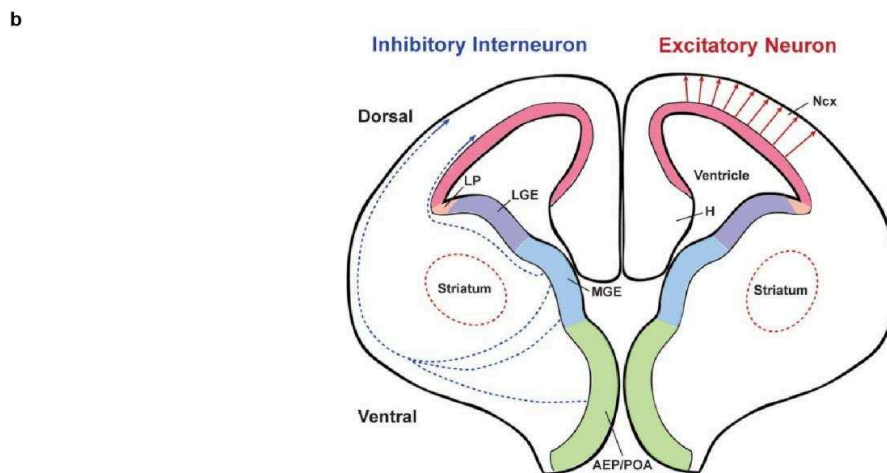
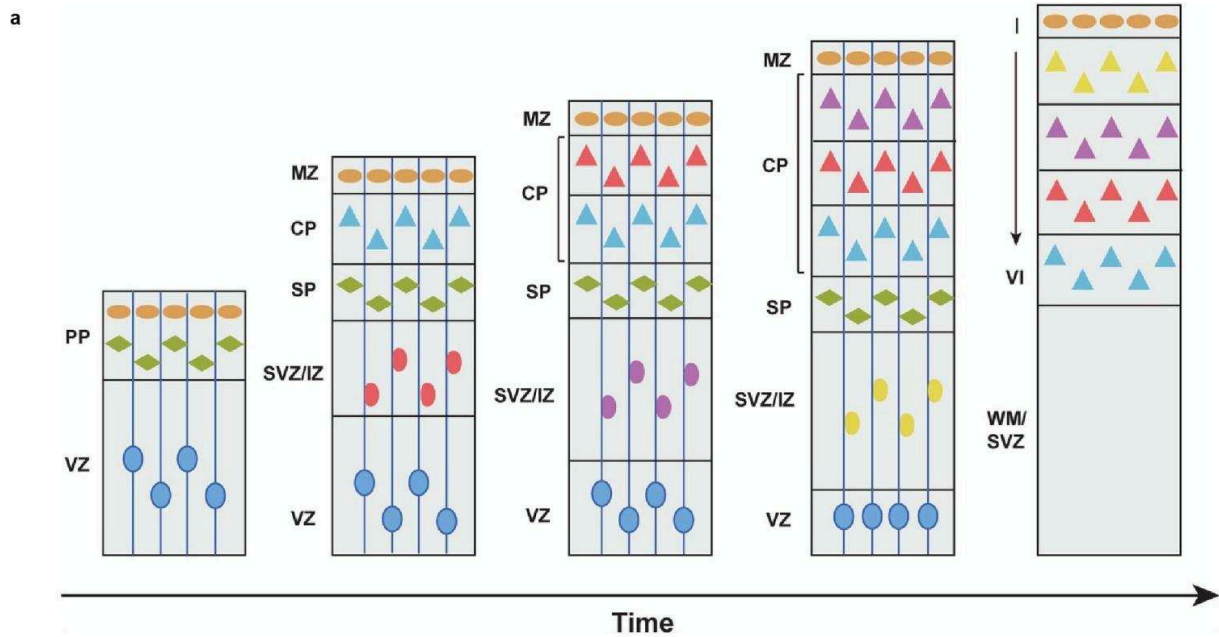


Figure 11. Formation "inside out" des couches corticales.

(a) La pré-plaque est formée par la production de la première vague de neurones post-mitotiques qui migrent de la zone ventriculaire vers la surface piale (en vert). Puis une seconde vague de neurones nouvellement générés (en bleu) migre à travers la zone sous ventriculaire et sépare la pré-plaque en zone marginale au-dessus et la sous-plaque, au dessous, établissant une nouvelle zone : la plaque corticale. Les vagues neuronales suivantes (en rouge, violet et jaune dans l'ordre) étendent la plaque corticale de l'intérieur vers l'extérieur. (b) Alors que les neurones excitateurs sont générés dans les zones prolifératives du télencéphale dorsal et migrent radialement vers la surface piale (flèches rouges), les interneurones inhibiteurs sont produits dans les zones prolifératives du télencéphale ventral (éminences ganglionnaires médiane et latérale (MGE et LGE), aires entopédonculaire antérieure (AEP) et pré-optique (POA)). (d'après Tan and Shi, 2013)

Ces six couches horizontales sont histologiquement et fonctionnellement distinctes (Ramón y Cajal, 1894) (Figure 12a). La couche moléculaire (I) contient majoritairement les axones et les dendrites des neurones pyramidaux. La couche granulaire externe (II) contient les neurones granulaires et reçoit les afférences d'autres aires corticales. La couche pyramidale externe (III) contient des neurones pyramidaux et envoie des projections axonales vers d'autres aires corticales. La couche granulaire interne (IV) contient des neurones étoilés et pyramidaux (classés ainsi suivant la complexité de leur arborisation dendritique) et reçoit des informations provenant de l'autre hémisphère cérébral et de l'extérieur du cortex cérébral. La couche pyramidale interne (V) envoie des projections en dehors du cortex cérébral et la couche polymorphe (VI) envoie des efférences vers le thalamus. Ces six couches corticales horizontales sont croisées par des colonnes plus discrètes mais déjà mentionnées sur les dessins de Ramón y Cajal et Lorente de Nó au début du XX^e siècle (Ramón y Cajal, 1891; Lorente de Nó, 1938; Larriva-Sahd, 2014). Les colonnes corticales sont composées de modules qui s'étendent perpendiculairement à la surface piale, de la couche VI à I (surface piale) (Szentagothai, 1978; Mountcastle, 1997; Goldman-Rakic, 2011) (Figure 12b). A l'intérieur de ces colonnes s'interconnectent des neurones qui peuvent ainsi former des unités fonctionnelles de base (Eccles, 1981) sur le plan somatique (Mountcastle et al., 1957), visuel (Hubel and Wiesel, 1969) ou encore impliqués dans la mémoire de travail (Goldman-Rakic, 1988, 1995).

3.3.3. Les acteurs moléculaires de la migration neuronale

Migration radiale

Comment les neurones atteignent-ils leur position finale au sein d'une couche corticale déterminée ? La migration radiale des nouveaux neurones peut être divisée en plusieurs étapes : l'initiation du mouvement, l'attachement à la fibre de la glie radiaire, le déplacement, qui implique une translocation nucléaire et pour finir le détachement (Marín and Rubenstein, 2003). Le processus de migration neuronale est contrôlé par un grand nombre de mécanismes différents. Parmi les nombreux acteurs et régulateurs moléculaires décrits, figurent des facteurs neurotrophiques (BDNF, EGF), des neurotransmetteurs (récepteurs au GABA et au glutamate) des glycoprotéines (astrotactine, intégrines), des gènes de régulation du cytosquelette des microtubules (*Lis1*, *Dcx*), et des protéines de liaison à l'actine (FLNA, FILIP) qui

Layers	Components	Schematic	Afferents	Efferents	
I – Molecular	Axons and Dendrites (Cell processes)		From other regions of Cortex and Brainstem	To other regions of cortex (Intra-cortical Association functions)	
II – External granular	Densely packed Stellate cells + Small pyramidal cells				
III – External pyramidal	Loosely packed Stellate cells + Medium pyramidal cells				
IV – Internal granular	Densely packed Stellate cells only			+ From Thalamus	
V – Internal pyramidal	Large pyramidal cells only (few stellate cells) – Giant Pyramidal cells of Betz			+ From Brain stem	To Brain stem & Spinal cord (Projection fibers)
VI – Multiform	Multiple sized pyramidal cells + Loosely packed stellate cells				To Thalamus

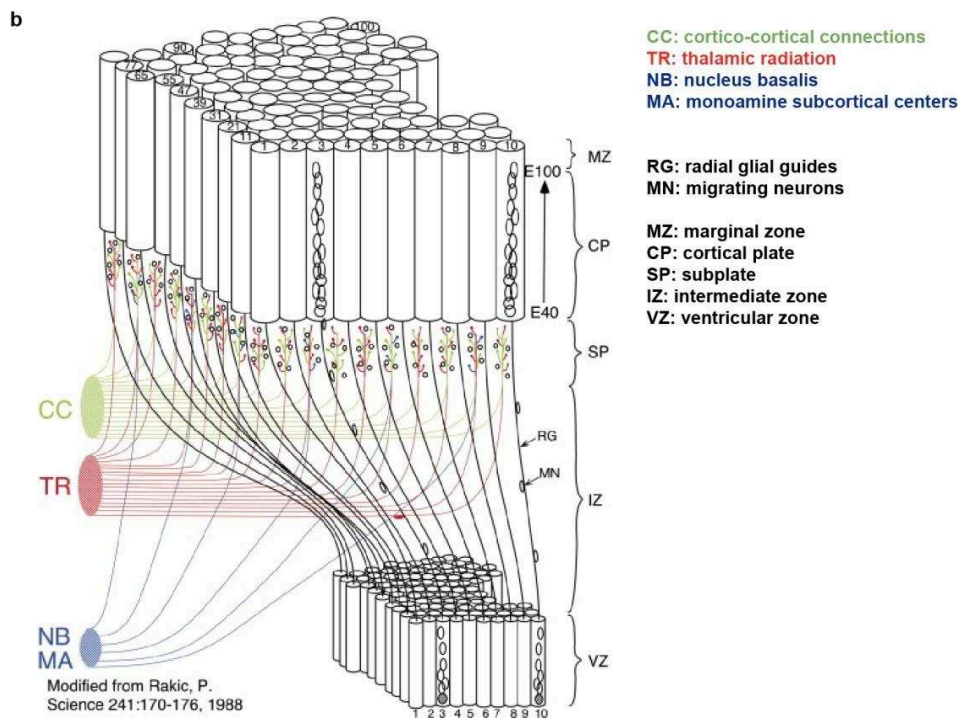


Figure 12. Les six couches horizontales du cortex cérébral.

(a) Inventaire des six couches horizontales corticales de la surface piale (I) vers les ventricules latéraux (VI) détaillant leur composition et leurs connexions avec le reste du système nerveux central. (image : *EpoMedicine.com*) (b) Modèle de migration radiaire chez le primate selon Rakic. Les cohortes de neurones générées dans la zone ventriculaire traversent les zones intermédiaires et de la sous-plaque contenant les afférences de diverses sources (CC, TR, MB, MA) et passent au-dessus des couches neuronales générées précédemment. Les neurones dans la sous-plaque et la plaque corticale conservent l'information de leur précédente position dans la zone ventriculaire pendant l'expansion corticale grâce à un échafaudage radial glial transitoire. (d'après *Rakic, 2007*)

interviennent à différents niveaux de la migration (Marín and Rubenstein, 2003) (Figure 13a-b).

Des molécules de guidage sont également impliquées. La voie Notch, qui joue aussi un rôle important dans les programmes de différenciation avec le maintien des progéniteurs à l'état indifférencié (Artavanis-Tsakonas, 1999), est en particulier impliquée dans le contrôle de la migration radiale des neurones corticaux via son interaction avec la reeline (Hashimoto-Torii et al., 2008). La protéine extracellulaire reeline, sécrétée par les cellules de Cajal-Retzius, qui sont les premiers neurones post-mitotiques générés, a été identifiée comme étant impliquée dans différentes étapes de la migration neuronale (Caviness, 1982; Frotscher, 1998; Lambert de Rouvroit and Goffinet, 1998; Tissir and Goffinet, 2003) (Figure 13a-b-c). Chez les mutants murins un défaut d'expression de la reeline donne lieu au phénotype *reeler* : après une étape de migration initiale normale, les neurones échouent à former des structures correctes à l'approche de leur destination, entraînant une désorganisation des couches corticales avec des inversions laminaires. Chez l'Homme, des mutations du gène *Reln* entraînent une lissencéphalie (Hong et al., 2000). D'autres signaux chimiques comme les éphrines et les sémaphorines sont exprimés en gradients pour attirer ou repousser les cellules en migration (Bagnard et al., 2001; Zimmer et al., 2008; Huang, 2009; Sentürk et al., 2011).

Des facteurs de transcription contrôlent également l'identité et la position laminaire des neurones en développement (Kwan et al., 2012; Luhmann et al., 2015). Par exemple, les gènes neurogéniques *Ngn1* et *Ngn2* sont requis pour le développement des couches inférieures, mais pas des couches supérieures (Schoorjans et al., 2004) et les facteurs de transcription *Cux2* et *Svet1* sont impliqués dans la formation des couches supérieures uniquement (Tarabykin et al., 2001; Zimmer et al., 2004) qui requiert également le récepteur nucléaire orphelin *Tlx* (Stenman et al., 2003; Wang and Xiong, 2016) et des interactions *Tlx* – *Pax6* (Schoorjans et al., 2004). A l'instar du mutant murin *Pax6*, où les couches corticales supérieures sont réduites, des défauts génétiques liés à ces facteurs peuvent entraîner des malformations du cortex cérébral et des retards mentaux (Davis et al., 2008).

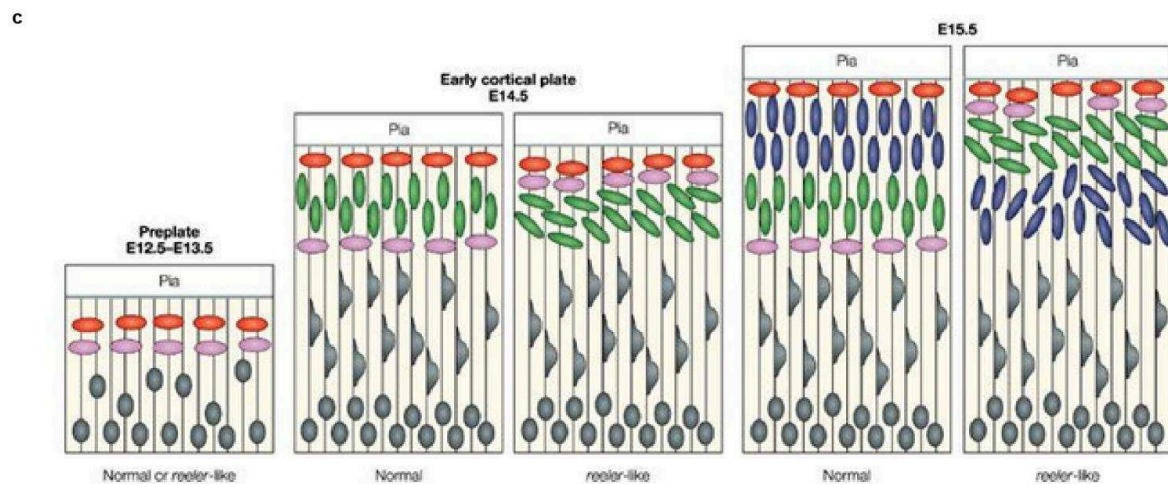
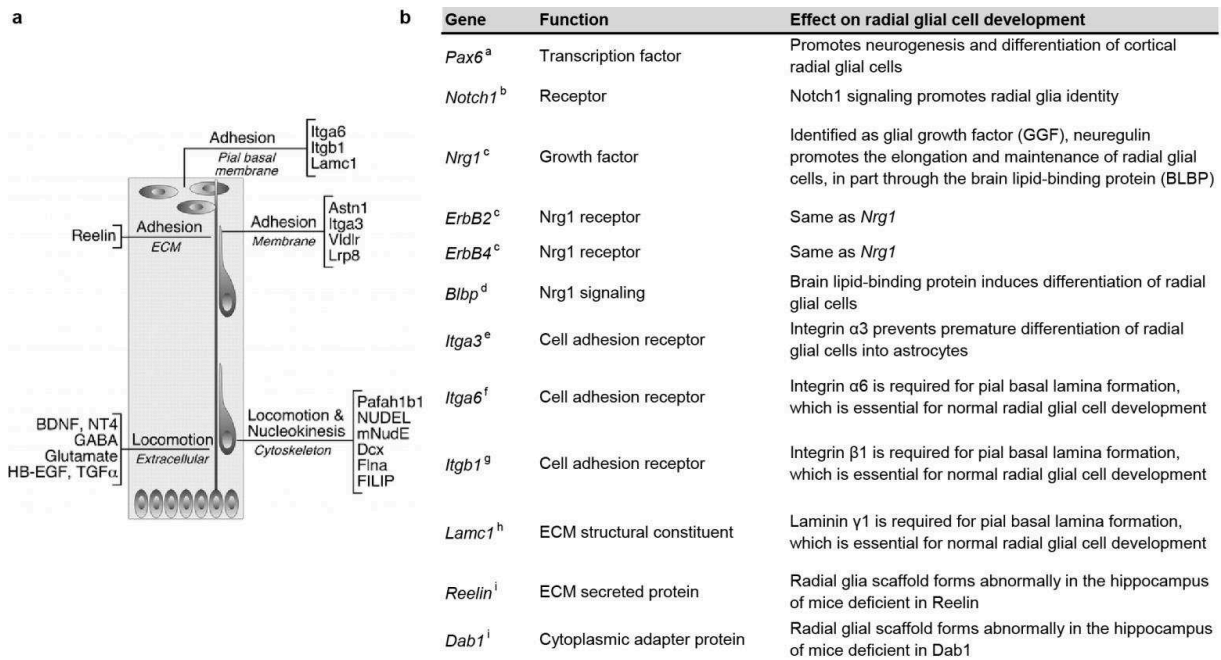


Figure 13. Mécanismes régulant la migration radiale dans le cortex cérébral.

(a) Représentation schématique des neurones migrant radialement dans le cortex cérébral. Les molécules impliquées dans la migration radiale sont indiquées en fonction de leur rôle (locomotion ou adhésion) et de leur localisation cellulaire. (d'après *Marín and Rubenstein, 2003*). (b) Facteurs affectant le développement des cellules de la glie radiaire et par conséquent la migration neuronale (d'après *Marín et Rubenstein, 2003*). (c) Perturbation de l'organisation des couches corticales dans le mutant *reeler* : à E13,5, les neurones pionniers migrent et forment un réseau perturbé de cellules *reelin*⁺ (en rose) et *reelin*⁻ (en rouge). A E14,5 la première cohorte de cellules est condensée dans la plaque corticale (en vert). La plaque corticale est composée de cellules orientées obliquement et ne sépare pas la pré-plaque en deux sous-couches. A E15,5 une seconde cohorte s'installe dans le tiers inférieur de la plaque corticale (en bleu), formant un gradient inversé (« outside-in »). (d'après *Tissir et Goffinet, 2003*)

Migration tangentielle

Si la migration des neurones pyramidaux est essentiellement radiale et bien documentée (Bielas et al., 2004; Marín and Rubenstein, 2003; Marín and Tsai, 2010), il est établi depuis récemment qu'elle est également tangentielle (Tan and Breen, 1993; Tan et al., 1995; Tabata and Nakajima, 2003; Noctor et al., 2004; LoTurco and Bai, 2006). Après leur passage par la zone sous ventriculaire, les neurones immatures adoptent temporairement une morphologie multipolaire, caractérisée par une capacité à migrer tangentiellement. Ils reprennent ensuite une morphologie bipolaire et poursuivent leur migration vers la plaque corticale (Tabata and Nakajima, 2003; Noctor et al., 2004). Les mécanismes impliqués dans ces processus sont encore mal connus mais un acteur moléculaire a déjà été identifié : l'éphrine B1 (Dimidschstein et al., 2013) (Figure 14). Les ligands de type éphrine et leurs récepteurs Eph sont répartis en 2 grandes catégories (A et B) et présentent une signalisation bi-directionnelle à la fois via les récepteurs Eph mais aussi via les éphrines transmembranaires. L'activation de la signalisation Eph/Ephrine se fait uniquement par interactions cellules-cellules (Himanen and Nikolov, 2003; Himanen et al., 2007). Les éphrines B sont caractérisées par leur attachement à la membrane par un domaine transmembranaire unique qui contient un motif de liaison PDZ (initiales issues des premières lettres des trois premières protéines découvertes partageant ce domaine : post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), et zonula occludens-1 protein (zo-1) (Kennedy, 1995)). Les éphrines B constituent par ailleurs des composants essentiels de la voie reeline (Sentürk et al., 2011). Dimidschstein et ses collègues ont montré que la forme constitutivement active de l'éphrine B1 entraîne la formation anormale de groupes de neurones chez la souris en restreignant l'extension de leurs neurites et leur migration tangentielle pendant la phase multipolaire via l'interaction de P-Rex1 GEF (facteur d'échange de la guanine sur Rac3, une GTPase) avec son domaine PDZ (Figure 14d). Puisque l'éphrine B1 est impliquée dans l'établissement d'une cytoarchitecture neuronale correcte, il est intéressant de déterminer si elle joue également un rôle dans la mise en place du réseau astroglial, directement par l'action de sa voie de signalisation sur les astrocytes corticaux ou indirectement par son rôle dans l'organisation spatiale des neurones pyramidaux. Cette question sera abordée en partie au cours de ces travaux de thèse.

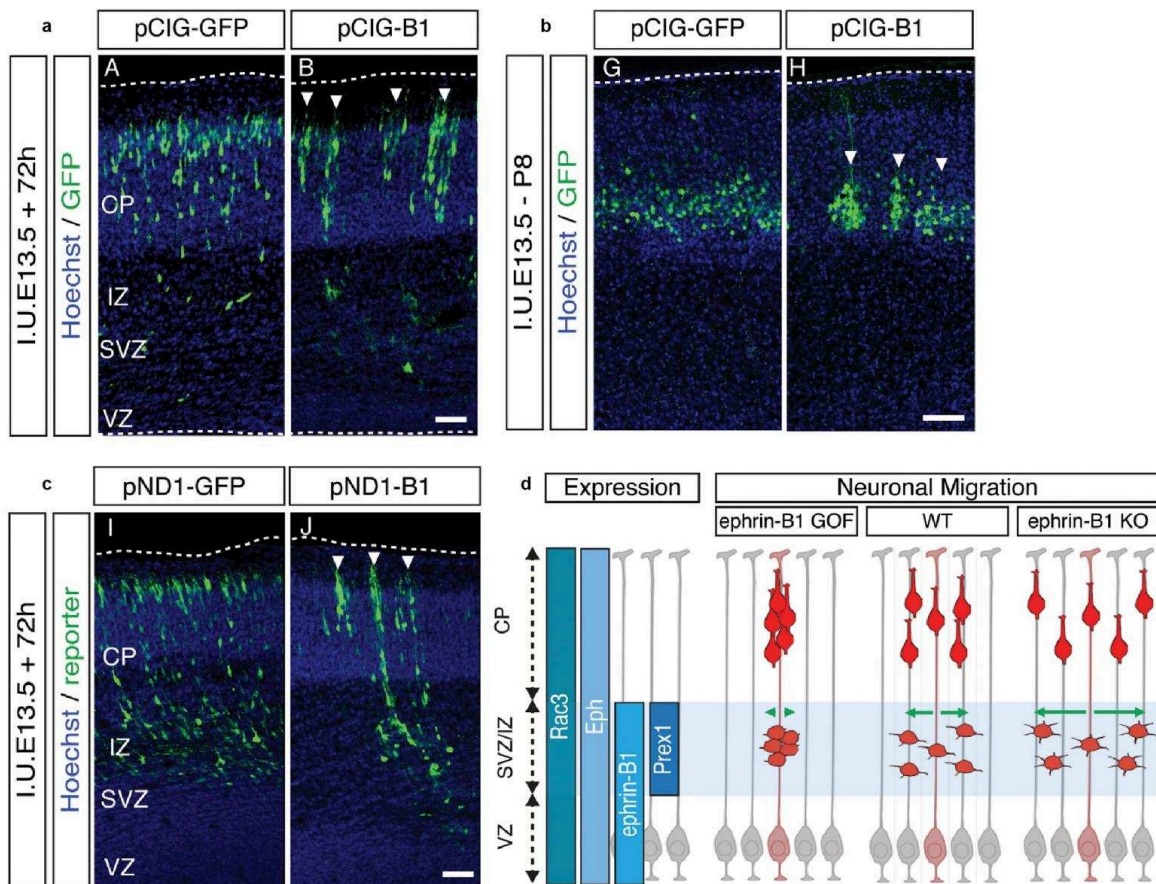


Figure 14. L'éphrine B1 contrôle la distribution colonnaire des neurones pyramidaux par restriction de leur migration tangentielle.

(a) La surexpression de l'éphrine B1 induite par électroporation *in utero* perturbe la distribution latérale des neurones pyramidaux dans la plaque corticale à 72h et P8 (b), que la perturbation soit sous contrôle du promoteur ubiquitaire CAG (a-b) ou du promoteur spécifique neuronal NeuroD1 (c), révélant une perturbation des neurones en migration plus que des cellules de la glie radiaire. (d) Modèle proposé: la signalisation inversée éphrine B1 agit via P-Rex1 GEF pour activer Rac3, module la morphologie et la migration tangentielle des neurones pyramidaux pendant leur phase multipolaire et ce mécanisme est requis pour générer des colonnes corticales ayant une dispersion latérale appropriée. GOF : gain of fonction ; KO : knock-out.

Barres d'échelle : a-c : 25 μm, b : 100 μm. (d'après Dimidschstein et al., 2013)

Ces différents facteurs, ainsi que les facteurs de transcription *Emx1* et *Emx2* et de nombreux autres jouent un rôle important dans l'établissement d'un réseau neuronal stéréotypé à la base de zones corticales fonctionnellement distinctes formant une carte (Bishop et al., 2000, 2002, 2003; Rash and Grove, 2006) et à l'intérieur desquelles les cellules gliales devront trouver leur place.

3.4. La phase gliogénique

Les deux types neuronaux majeurs du cortex cérébral, les neurones excitateurs et les interneurons GABAergiques proviennent de progéniteurs différents de la zone ventriculaire dorsale (pallium) et des éminences ganglionnaires (subpallium) respectivement. Est-ce également le cas pour les astrocytes ? Les astrocytes sont issus également de sources variées dont certaines sont encore aujourd'hui controversées : les cellules de la glie radiaire embryonnaire, les progéniteurs de la zone sous ventriculaire postnatale (ou zone sous épendymaire) et enfin les divisions locales dans le parenchyme cortical, témoignant d'une grande hétérogénéité développementale (Tabata, 2015).

3.4.1. La production d'astrocytes par les cellules de la glie radiaire

Les cellules de la glie radiaire perdent leur potentiel neurogénique à la fin de la neurogenèse et acquièrent progressivement la plupart des caractéristiques des astrocytes, ce en quoi beaucoup d'entre elles se transformeront (Voigt, 1989; Culican et al., 1990; Malatesta et al., 2003; Mori et al., 2005). Ce basculement des cellules de glie radiaire d'une production exclusivement neuronale vers la production astrocytaire est appelé "transition gliogénique" et est régulé dans le cortex cérébral par des facteurs intrinsèques et épigénétiques (Guérout et al., 2014). Parmi eux, la voie de signalisation JAK-STAT est impliquée via l'activation de JAK par des cytokines de la famille de l'interleukine-6, comme le CNTF (ciliary neurotrophic factor), le LIF (leukemia inhibitory factor) ou CT-1 (cardiotrophin 1) qui entraîne l'activation des facteurs de transcription STAT (Barnabé-Heider et al., 2005). STAT3 favorise en particulier la transcription de gènes astrocytaires comme *GFAP* et *S100β* et est indispensable à l'astrogenèse (He et al., 2005). La transition gliogénique des cellules de glie radiaire est régulée par plusieurs mécanismes, dont la compétition des facteurs de transcription neurogéniques fortement exprimés pendant la neurogenèse, comme neurogenin1, avec STAT3 pour des co-activateurs, empêchant

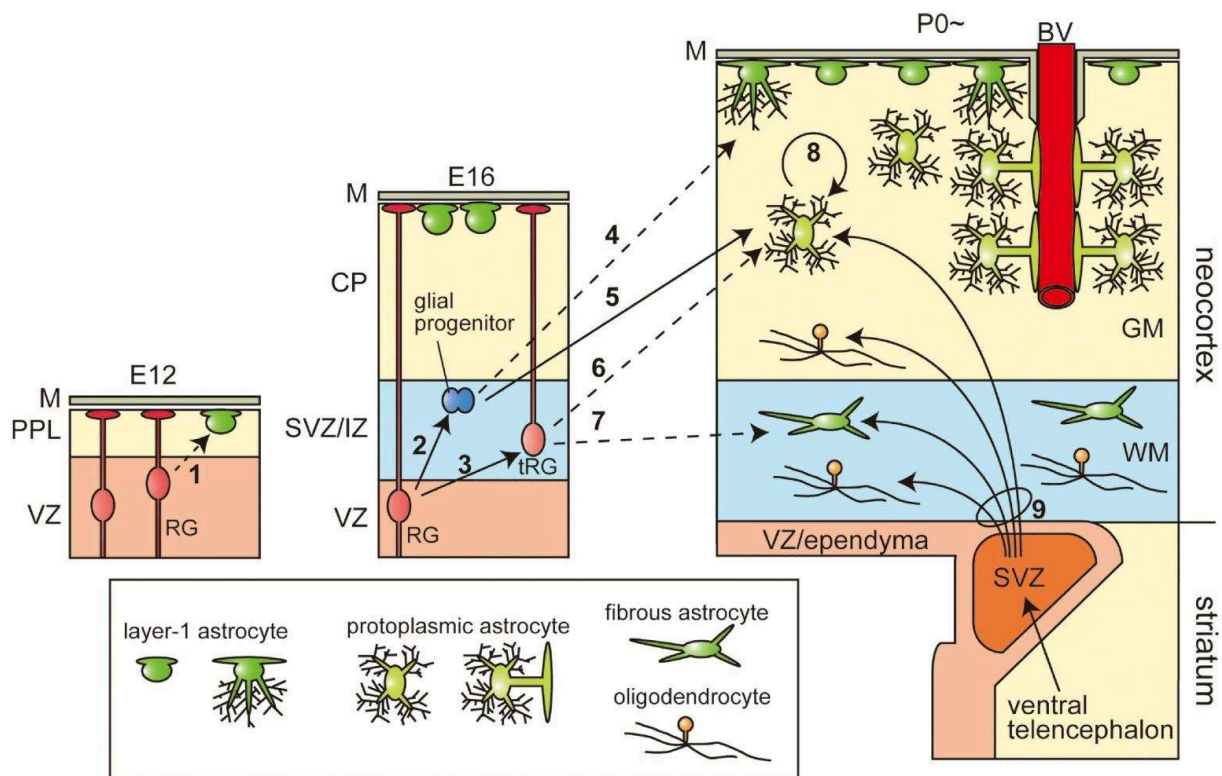


Figure 15. Les multiples origines des astrocytes.

Production et positionnement final des astrocytes au cours du développement cortical. Les flèches en traits pleins indiquent les relations de lignage cellulaire confirmées par les expériences de traçage. Les flèches avec des lignes brisées montrent des hypothèses de lignage cellulaire communes obtenues par des investigations histologiques, mais qui ne sont pas confirmées par un traçage précis. Les neurones et les précurseurs d'oligodendrocytes ne sont pas affichés. (1) Des cellules venant de la VZ pourraient monter jusqu'à la surface piaie pour se différencier en astrocytes de la couche I et former la membrane limitante gliale subpiaie très tôt au cours du développement. (2) Les astrocytes sont supposés être issus de progéniteurs gliaux situés dans la V-SVZ (provenant eux-mêmes des cellules de glie radiaire) mais aussi de la transformation directe des cellules de la glie radiaire (3-6) qui pourraient également générer de cette façon des astrocytes fibreux (7). (4) D'autre part, les astrocytes de la couche I adopteraient des astrocytes nouvellement générés venant de la SVZ au cours du développement. (5) Les progéniteurs gliaux de la V-SVZ embryonnaire se différencient en astrocytes. (8) La prolifération locale d'astrocytes différenciés est une source importante d'astrocytes protoplasmiques dans le parenchyme. (9) Les progéniteurs gliaux migrent dorsalement et se différencient en astrocytes et en oligodendrocytes dans les substances grise et blanche à partir de la SVZ postnatale. (d'après Tabata, 2015)

l'astrogenèse, et le blocage la différenciation astrocytaire par la méthylation des promoteurs de gènes astrocytaires, empêchant la transcription de ces gènes et rendant les cellules de glie radiaire insensibles aux cytokines de la famille de l'interleukine-6. La signalisation Notch, impliquée dans l'inhibition de la neurogenèse, favorise ensuite l'astrogenèse (Namihira et al., 2009) en régulant la méthylation/déméthylation des promoteurs de gènes astrocytaires lorsque la signalisation JAK-STAT3 est activée. Enfin les cytokines gliogéniques sont sécrétées en quantités de plus en plus grandes par les neurones nouvellement générés, favorisant ainsi l'astrogenèse (Barnabé-Heider et al., 2005).

Les astrocytes sont détectés par immunomarquage de l'antigène GFAP dès E16 dans la moelle épinière de souris (Liu et al., 2002) mais les périodes précises de production astrocytaire dans le cortex cérébral sont moins bien connues. Si l'isolation des cellules de la glie radiaire corticales révèle une prépondérance du lignage neuronal entre E14 et E16, les cellules de la glie radiaire génèrent en revanche majoritairement des astrocytes à E18 (Malatesta et al., 2000). Les progéniteurs gliaux migrent dans la substance blanche et dans la substance grise et se différencient en astrocytes fibreux et protoplasmiques respectivement (Gressens et al., 1992; Tabata, 2015). Les astrocytes sont également produits à partir de la différenciation directe des cellules de la glie radiaire qui subissent des changements morphologiques (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009), perdent leur contact avec la surface apicale, deviennent unipolaires, puis rétractent leurs fibres radiales, éloignent leur corps cellulaire de la zone ventriculaire par "somal translocation" pour finir par devenir multipolaires (Morest, 1970; Choi and Lapham, 1978; Schmechel and Rakic, 1979; Pixley and de Vellis, 1984; Misson et al., 1991) avec, chez l'Homme, un passage par des morphologies intermédiaires en fonction de leur position radiale (deAzevedo et al., 2003). Elles adoptent ainsi progressivement une morphologie astrocytaire. Des études du lignage des cellules de la glie radiaire ont par ailleurs montré qu'elles peuvent produire individuellement de manière successive neurones et cellules gliales (Walsh and Cepko, 1988; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Noctor et al., 2004; Magavi et al., 2012) mais d'autres études ont mis en évidence des progéniteurs à potentialité restreinte ne générant que certains sous-types neuronaux ou gliaux (Luskin et al., 1988; Luskin, 1993; Price and Thurlow, 1988; Grove et al., 1993; Parnavelas, 1999; McCarthy et al., 2001). La question de la

capacité des progéniteurs à générer ou non différents types cellulaires, mais aussi des progéniteurs intermédiaires spécifiques et ce en fonction du temps reste encore sans réponse claire. Au début de la gliogenèse, les modes de production d'astrocytes par la glie radiaire semblent donc variés (production de progéniteurs gliaux, transformation directe), mais ces dernières ne représentent pas l'unique source d'astrocytes dans le cortex cérébral dont la majeure partie de la production s'achève seulement au cours du premier mois postnatal (Bayraktar et al., 2015).

3.4.2. La contribution des progéniteurs de la zone sous ventriculaire postnatale au réseau astrocytaire

D'après les travaux de Goldman, les cellules de la glie radiaire, qui sont Nestin+ (Burns et al., 2009), disparaissent peu de temps après la naissance (Goldman, 1995; Marshall et al., 2003). A cause de la disparition de la glie radiaire, les astrocytes générés par la suite sont présumés provenir des progéniteurs de la zone sous ventriculaire, non rattachés à la surface piaie, contrairement aux cellules de la glie radiaire (Goldman, 1997), et ce jusqu'à P14 (Levison and Goldman, 1993). Une étude utilisant des souris Nestin-CreER montre également la présence de progéniteurs gliaux Nestin+, non rattachés à la surface piaie et proliférant, au niveau de la zone sous ventriculaire après injections de tamoxifène à la fin de l'embryogenèse (Burns et al., 2009). La gliogenèse périnatale se produit donc à la fois au niveau de la zone ventriculaire où se trouvent les cellules de la glie radiaire et au niveau de la zone sous ventriculaire où se trouvent des progéniteurs intermédiaires (Levison et al., 1999) qui donnent naissance à des cellules migrant vers la substance blanche et le cortex cérébral et se différenciant en astrocytes ou oligodendrocytes (Levison and Goldman, 1993; Parnavelas, 1999; Kakita and Goldman, 1999; Marshall and Goldman, 2002). Il a même été montré, grâce à des expériences d'injections de rétrovirus codant la GFP et d'imagerie en temps réel, que quelques précurseurs d'astrocytes et d'oligodendrocytes issus de la zone sous ventriculaire postnatale (P0) migrent jusqu'à l'hémisphère cérébral opposé via le corps calleux le long des axones non myélinisés (Kakita et al., 2003). Cependant, aucune autre étude n'a jusqu'ici confirmé ce résultat.

Si l'ensemble de ces études impliquent globalement la zone sous ventriculaire postnatale dans la production d'astrocyte corticaux, de récents travaux utilisant des

électroporations postnatales pour marquer les progéniteurs de la zone sous ventriculaire postnatale montrent très peu d'astrocytes du cortex cérébral générés par ces progéniteurs, remettant en question la contribution des progéniteurs postnataux, et statuant donc que les astrocytes corticaux sont issus majoritairement des divisions de progéniteurs disséminés dans le parenchyme cortical (Ge et al., 2012).

3.4.3. La prolifération locale postnatale : une source majeure d'astrocytes

Ramón y Cajal fut le premier à suggérer que les astrocytes matures peuvent se diviser dans le parenchyme cortical après avoir observé des paires d'astrocytes connectées par leurs somas (Ramón y Cajal, 1913) (Figure 16a). Cette observation fut par la suite étayée par le recensement de figures mitotiques et de cellules ayant incorporé la ³H-thymidine (analogue du BrdU, marqueur de synthèse d'ADN (Duque and Rakic, 2011)) en microscopie électronique (Smart and Leblond, 1961; Mori and Leblond, 1969; Ichikawa et al., 1983; García-Marín et al., 2007; Fan and Agid, 2018). Des autoradiographies en microscopie photonique après injections de ³H-thymidine chez le rat révèlent également jusqu'à 8% de cellules non neuronales en prolifération dans le cortex visuel durant la première semaine postnatale tandis que la mort cellulaire semble limitée : seulement 0,2% de cellules non neuronales apparaissent pycnotiques, c'est-à-dire avec un noyau altéré (indice de mort cellulaire) (Mares and Bruckner, 1978). D'autres travaux chez la souris suggèrent que les astrocytes peuvent être générés localement à partir de cellules progénitrices gliales après leur migration vers la zone marginale (Beckervordersandforth et al., 2010). La prolifération locale est une source d'astrocytes dès le stade embryonnaire au sein de la plaque corticale : des expériences d'imagerie en temps réel sur des tranches de cerveau murin à E18 en culture montrent en effet des cellules gliales issues de progéniteurs Nestin+ se diviser dans le parenchyme de manière symétrique, à raison d'une division toutes les douze heures (Burns et al., 2009) (Figure 16b). Une étude plus récente montre également que la prolifération locale postnatale est bien la source majeure d'astrocytes dans le cortex cérébral postnatal chez la souris via des divisions symétriques d'astrocytes différenciés (Ge et al., 2012; Ge and Jia, 2016) (Figure 16c). L'étude se base sur deux stratégies expérimentales : i) des injections de rétrovirus entre P0 et P9 directement dans les couches supérieures corticales

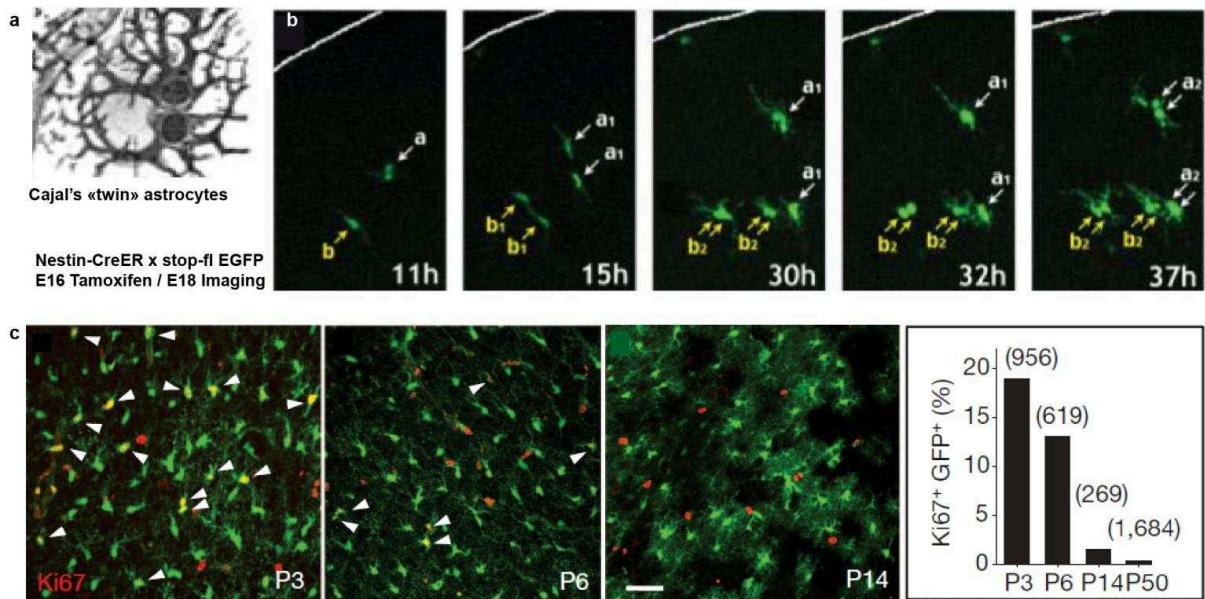


Figure 16. Prolifération locale des astrocytes corticaux.

(a) Les astrocytes jumeaux de Ramón y Cajal, connectés par leurs somas (*d'après Oberheim et al., 2012*) (b) Glioblastes issus de cellules Nestin+ à E16 effectuant plusieurs divisions successives dans le parenchyme cortical à partir d'E18 (*d'après Burns et al., 2009*) (c) La prolifération locale, visualisée avec le marqueur Ki67 dans le parenchyme cortical de souris *hGFAP-GFP* diminue au cours de la première semaine postnatale. (*d'après Ge et al., 2012*).

permettant l'expression de la GFP dans les cellules infectées en division et dans leur descendance associées à des marquages GFAP ou BLBP pour identifier les astrocytes, ii) l'utilisation de souris hGFAP-CreER;Ai14;CAG fucci green. Dans ces souris, l'expression de la protéine fluorescente rouge tdTomato est déclenchée après la naissance dans les cellules GFAP+ par l'activation de l'enzyme recombinase Cre par injection de tamoxifène et les cellules en prolifération sont visualisables grâce au senseur fucci qui rend fluorescentes les cellules en phases S à M. Ainsi cette étude montre que si environ 19% des astrocytes corticaux sont en prolifération à P3, ce niveau chute progressivement jusqu'à atteindre 1,5% à P14. Cependant, il reste à déterminer si tous les astrocytes différenciés peuvent proliférer ou s'il existe des progéniteurs intermédiaires qui exprimeraient des marqueurs moléculaires particuliers ou encore si des astrocytes matures peuvent revenir à un stade intermédiaire et se diviser et, le cas échéant, est-ce le cas pour tous les astrocytes ?

Ramón y Cajal associait déjà les paires d'astrocytes ou doublets à des figures prolifératives, ce que semblent confirmer les travaux de Ge et al. en contexte développemental. Une autre étude confirme cette théorie en contexte pathologique avec l'observation de doublets immunopositifs pour le marqueur de division cellulaire Ki67 uniquement après lésion corticale chez l'adulte (Bardehle et al., 2013), et situés préférentiellement au contact des vaisseaux sanguins. Cependant, une étude récente réalisée chez le furet les observe également chez l'adulte sain tout en leur attribuant plutôt un rôle fonctionnel (López-Hidalgo et al., 2016). Ce travail décrit des paires d'astrocytes ou "kissing astrocytes" dont les corps cellulaires sont en contact, immunonégatifs pour des marqueurs de division cellulaire (Ki67, BrdU), et retrouvés dans des proportions variables selon les couches corticales avec plus de 20% des astrocytes appartenant à cette catégorie dans les couches III et IV, qui sont la cible d'afférences thalamiques, et 10% dans la couche II, suggérant un lien avec les organisations synaptiques particulières de chaque couche. D'autres études morphologiques évoquent la présence de doublets d'astrocytes grâce à la visualisation de corps cellulaires en contact par des colorations de Golgi (Kosaka and Hama, 1986) ou des immunomarquages révélant l'antigène S100 β (Ogata and Kosaka, 2002) sans toutefois préciser leurs éventuelles fonctions. Le lien entre doublets et prolifération mérite par conséquent d'être approfondi.

Si les différents résultats concernant la prolifération locale embryonnaire puis essentiellement postnatale d'astrocytes dans le cortex cérébral semblent donner une certaine homogénéité au mode de production astrocytaire, où une prolifération locale massive durant la première semaine de vie pourrait expliquer l'augmentation du nombre de cellules gliales observé au cours des premières semaines postnatales (Bandeira et al., 2009) tandis que la taille du cerveau augmente, d'autres sources d'astrocytes ont cependant été documentées.

3.4.4. D'autres sources d'astrocytes corticaux

Grâce à des observations de colorations de Golgi, il a également été proposé que les astrocytes de la couche I soient produits en partie dès le stade pré-plaque avec la migration de cellules provenant de la zone ventriculaire jusqu'à la surface piale puis leur différenciation en astrocytes (Marín-padilla, 1995). Ceux-ci seraient rejoints bien plus tard par les astrocytes provenant de la zone sous ventriculaire, sans que l'on sache si ces deux origines correspondent aux différents sous-types d'astrocytes observés à la surface piale (de type fibroblaste ou protoplasmique). Les cellules NG2+, exprimant le protéoglycan NG2 (retrouvé également dans certaines cellules endothéliales et certains péricytes), longtemps présumées précurseurs d'oligodendrocytes seulement, peuvent également produire des astrocytes : un résultat obtenu grâce à l'utilisation de nouvelles lignées de souris transgéniques exprimant la protéine rapportrice DsRed sous promoteur NG2 (Zhu et al., 2007). Dans le cerveau antérieur murin, le marqueur NG2 est détecté après E15 (Nishiyama et al., 2002; Dawson et al., 2000, 2003; Peters, 2004), ce qui semble coïncider avec le début de l'astrogliogénèse. D'autre part, des études du lignage des cellules Olig2+, montrent qu'elles peuvent donner naissance elles aussi à des astrocytes corticaux (Cai et al., 2007; Ono et al., 2008). Si ces éléments renforcent l'idée que les astrocytes proviennent de différentes origines cellulaires (Oberheim et al., 2012), il n'est pas encore établi que cette diversité développementale soit à l'origine de l'hétérogénéité morphologique moléculaire et fonctionnelle observée dans les astrocytes corticaux.

3.5. La maturation du cortex cérébral

Au début de la gliogénèse, le cortex cérébral est déjà composé des neurones qui formeront les six couches corticales se stabilisant aux alentours de P10 et qui

perdureraient chez l'adulte. Si la mise en place du réseau neuronal semble chronologiquement et spatialement bien définie, la mise en place du réseau astroglial l'est beaucoup moins, à cause notamment de la diversité des sources d'astrocytes dont les contributions individuelles sont mal connues. La mise en place de ce réseau a lieu dans un contexte neuronal dynamique où les cellules sont en pleine maturation.

3.5.1. Maturation neuronale

Après leur division terminale dans la zone ventriculaire (E11-E13, divisions asymétriques) et sous ventriculaire (E13-E16, divisions symétriques de progéniteurs intermédiaires) les neurones migrent dans la plaque corticale et adoptent leur position laminaire finale (Dwyer et al., 2016). Les cellules doivent ensuite se différencier en neurones fonctionnels dotés de connexions synaptiques appropriées. Les neurones projettent d'abord leur axone vers la substance blanche grâce à des signaux extracellulaires locaux, avant que d'autres signaux de guidage axonal ne les dirigent de la substance blanche à leur destination finale (Marín-Padilla, 2014). Les dendrites apicales des neurones pyramidaux obtiennent également des informations directionnelles pour se diriger vers la surface piaie, dans la direction opposée (Marín-Padilla, 2014). Lorsque la polarité initiale d'un neurone est établie, plusieurs dendrites primaires apparaissent au niveau du corps cellulaire, subissent une croissance importante et se ramifient. Des branches collatérales sont générées et servent de sites synaptiques majeurs. Les neurones peuvent alors atteindre une morphologie mature et recevoir des afférences d'autres régions corticales ou d'ailleurs dans le cerveau (Dwyer et al., 2016) et ce en fonction de leur localisation dans le parenchyme cortical. Les neurones pyramidaux situés dans différentes couches corticales vont ainsi avoir une connectivité, une morphologie dendritique et des propriétés fonctionnelles variables (Feldmeyer, 2012; Harris and Shepherd, 2015). Avant la naissance, la densité synaptique augmente rapidement puis diminue avec l'élimination des connexions surnuméraires jusqu'à la puberté, pour finir par se stabiliser (Huttenlocher, 1990). En même temps, le réseau astrocytaire s'étend.

3.5.2. Maturation astrocytaire

Durant le développement cortical, et en particulier pendant les premières semaines postnatales, la population astrocytaire grandit à l'échelle du réseau et à

l'échelle des cellules. De quelle manière ce réseau finira-t-il par couvrir le cortex cérébral de manière continue ?

3.5.2.1. L'organisation astrocytaire à l'échelle du réseau

Les astrocytes ont-ils un développement colonnaire à l'instar des neurones ? Un mécanisme "inside out" détermine-t-il leur position radiale ? Ces mécanismes sont-ils propres aux astrocytes ou dépendants de signaux neuronaux et sont-ils à l'origine de certaines hétérogénéités fonctionnelles observées ? La régionalisation des astrocytes a surtout été étudiée dans la moelle épinière où des travaux montrent que les astrocytes sont attribués à des domaines spatiaux particuliers, ou "astromères" selon leur origine embryonnaire spatiotemporelle dans la zone ventriculaire (Tien et al., 2012; Tsai et al., 2012; Bayraktar et al., 2015) (Figure 17). Dès le début de l'embryogenèse, des gradients de signaux extracellulaires comme Shh (Sonic Hedgehog) en ventral et BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) en dorsal permettent une fine segmentation du neuroépithélium en domaines de progéniteurs dorsoventraux (Jessell, 2000; Rowitch, 2004) via la régulation de certains facteurs de transcription à homéodomaines ou à motifs hélice-boucle-hélice (bHLH). Cela aboutit aux différents domaines de la moelle épinière d'où sont issues les différentes catégories de neurones (les domaines p0 à p3 pour les interneurones et pMN pour les neurones moteurs) (Campbell, 2003; Puelles and Rubenstein, 2003). Après cette phase neurogénique, les domaines de progéniteurs neuronaux passent en production gliale vers E12,5 et plusieurs données indiquent une régionalisation astrocytaire à partir des progéniteurs : premièrement l'expression restreinte au domaine p2 ventral de SCL (stem cell leukemia), codant pour une protéine bHLH, favorisant la génération d'astrocytes et empêchant celle des oligodendrocytes via l'inhibition d'Olig2 (Muroyama et al., 2005) et deuxièmement l'expression combinatoire des protéines à homéodomaines Pax6 et Nkx6.1 distinguant les domaines p0 à p3. Ce schéma d'expression différencie trois sous populations astrocytaires dans la substance blanche qui sont moléculairement hétérogènes, exprimant soit la reeline, soit Slit soit une combinaison de ces deux molécules, et dont l'arrangement dorsoventral mime celui de leurs domaines progéniteurs respectifs avec une dispersion tangentielle des astrocytes limitée (Hochstim et al., 2008). De plus les analyses du lignage des cellules de la glie radiaire et de leur descendance à l'aide de lignées transgéniques Cre spécifiques de ces régions montrent une distribution

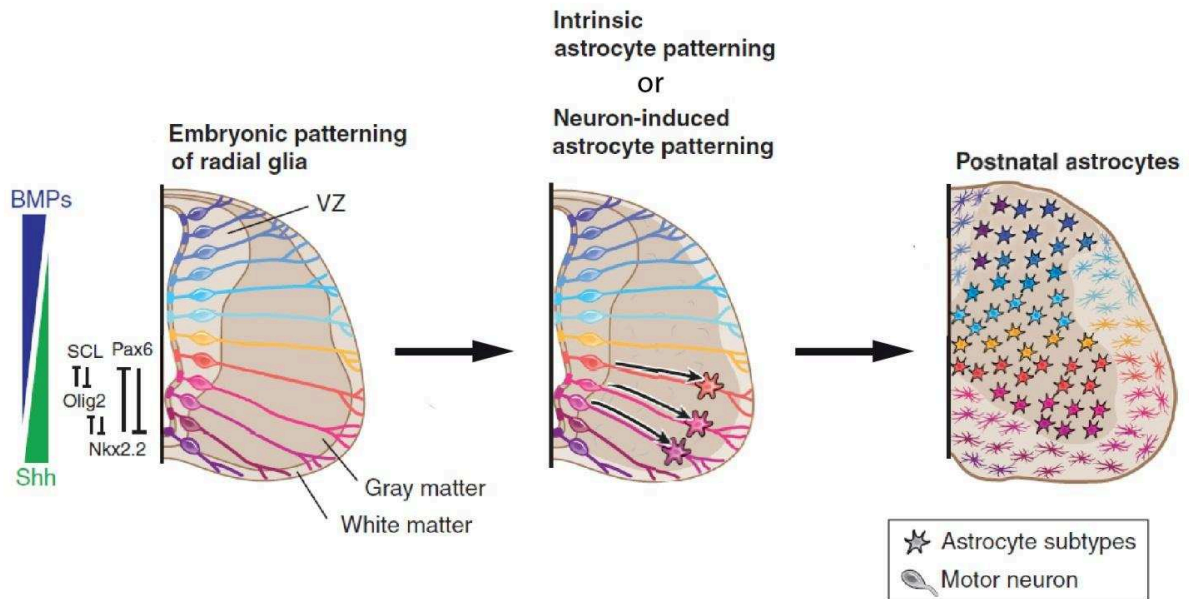


Figure 17. Spécification de l'hétérogénéité astrocytaire régionale dans la moelle épinière.

La structuration embryonnaire le long de l'axe dorsoventral donne lieu à une glie radiaire spécifiée régionalement. La signalisation par Shh et les BMP régule l'expression des facteurs de transcription segmentaires et les interactions répressives croisées affinent les domaines des progéniteurs. Après la neurogenèse, les astrocytes sont générés dans tous les domaines de la moelle épinière. Ils migrent latéralement le long des trajectoires de glie radiaire et ne subissent pas de migration tangentielle à partir de leurs domaines d'origine. La structuration embryonnaire spécifie régionalement des astrocytes distincts. L'hétérogénéité segmentaire des astrocytes fibreux et protoplasmiques pourrait donner naissance à des astromères (c'est-à-dire des domaines d'astrocytes ayant des fonctions distinctes) à des stades postnataux. (d'après Bayraktar et al., 2015)

spatiale des astrocytes strictement restreinte à la trajectoire de leur progéniteur de glie radiaire (Tsai et al., 2012), à l'origine des "astromères" maintenues à l'âge adulte, et composées d'astrocytes régionalement spécialisés et adaptés au support des sous-types neuronaux locaux (Bayraktar et al., 2015).

Cette régionalisation peut-elle être généralisée au reste du système nerveux central ? Le long de l'axe dorsoventral du cerveau antérieur, des domaines de cellules de glie radiaire existent : le pallium, les éminences ganglionnaires et le septum (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Les astrocytes corticaux issus de croisements de souris *RosaSTOPtdTomato* avec des souris *Emx1-cre*, *Dbx1-cre*, ou *Nkx2.1-cre* spécifiques des précurseurs des régions dorsales, intermédiaires et ventrales du cerveau antérieur respectivement sont distribués spatialement selon leurs domaines d'origine et les conservent de manière stable même après lésion (Tsai et al., 2012) (Figure 18). Le cortex, ou pallium, se divise en pallium médial, dorsal, latéral et ventral qui formeront l'hippocampe, le néocortex, le cortex piriforme/olfactif, et le claustrum (ou avant-mur) et certaines parties de l'amygdale respectivement. Qu'en est-il à l'intérieur de ces régions bien spécifiques et en particulier dans le cortex cérébral, la région d'intérêt de ces travaux de thèse ? Chacun de ces domaines est lui-même divisé en sous-domaines, (Sur and Rubenstein, 2005; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009) qui diffèrent par leur localisation, organisation histologique, connectivité, propriétés moléculaires et fonctionnelles. Les régions rostrales régulent les fonctions exécutives et motrices tandis que les régions caudales traitent les informations somatosensorielles, auditives et visuelles. A l'échelle de ces régions, des analyses clonales de la descendance des cellules de la glie radiaire marquée par des infections de la surface corticale de souris *Z/EG* par l'adenovirus Cre pour marquer quelques cellules de la glie radiaire (Tsai et al., 2012) ou par l'utilisation de lignées *Z/EG* croisées avec des souris *thy1.2-cre* recombinant la Cre de manière éparsée (Magavi et al., 2012) mettent en évidence des colonnes radiales, comprenant à la fois des neurones pyramidaux et des astrocytes (Magavi et al., 2012) (Figure 19). Ceci confirme les résultats obtenus dans la moelle épinière à savoir que le réseau astrocytaire cortical se développerait en territoires initialement occupés par les prolongements des cellules de glie radiaire dont ils sont originaires (Bayraktar et al., 2015) et selon le modèle d'unités radiaires

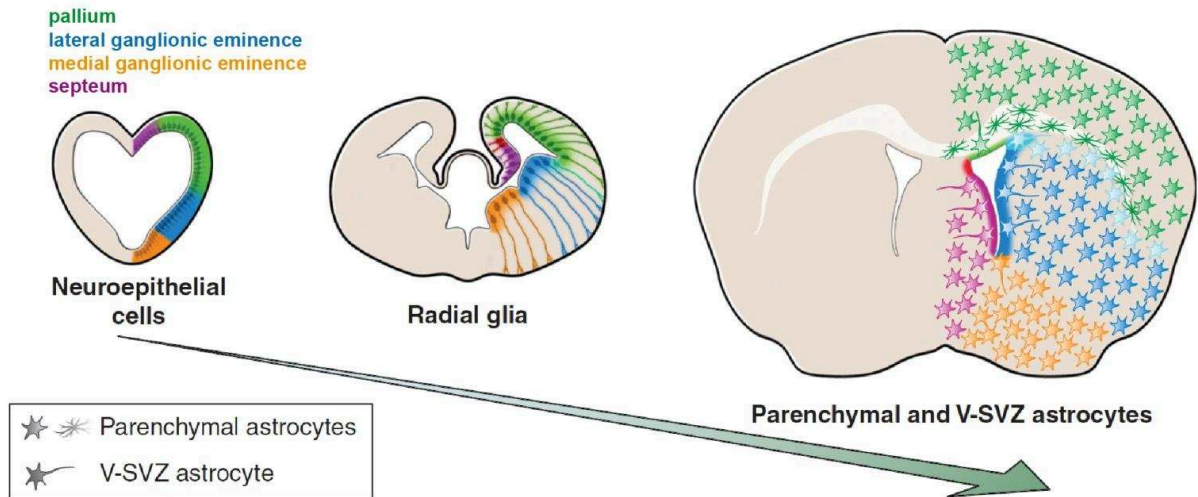


Figure 18. Origines développementales de l'hétérogénéité des astrocytes parenchymateux et de la V-SVZ chez l'adulte.

Au cours du développement, les cellules neuroépithéliales, de la glie radiaire et les astrocytes se spécialisent régionalement : les cellules neuroépithéliales et de la glie radiaire de différentes régions du cerveau antérieur en développement y compris le pallium, les éminences ganglionnaires latérales et médiales et le septum, donnent naissance aux cellules souches neurales de la V-SVZ au niveau des différentes parois des ventricules latéraux et aux astrocytes parenchymateux, qui maintiennent des signaux positionnels importants pour contrôler la descendance des premières et la fonction des seconds.

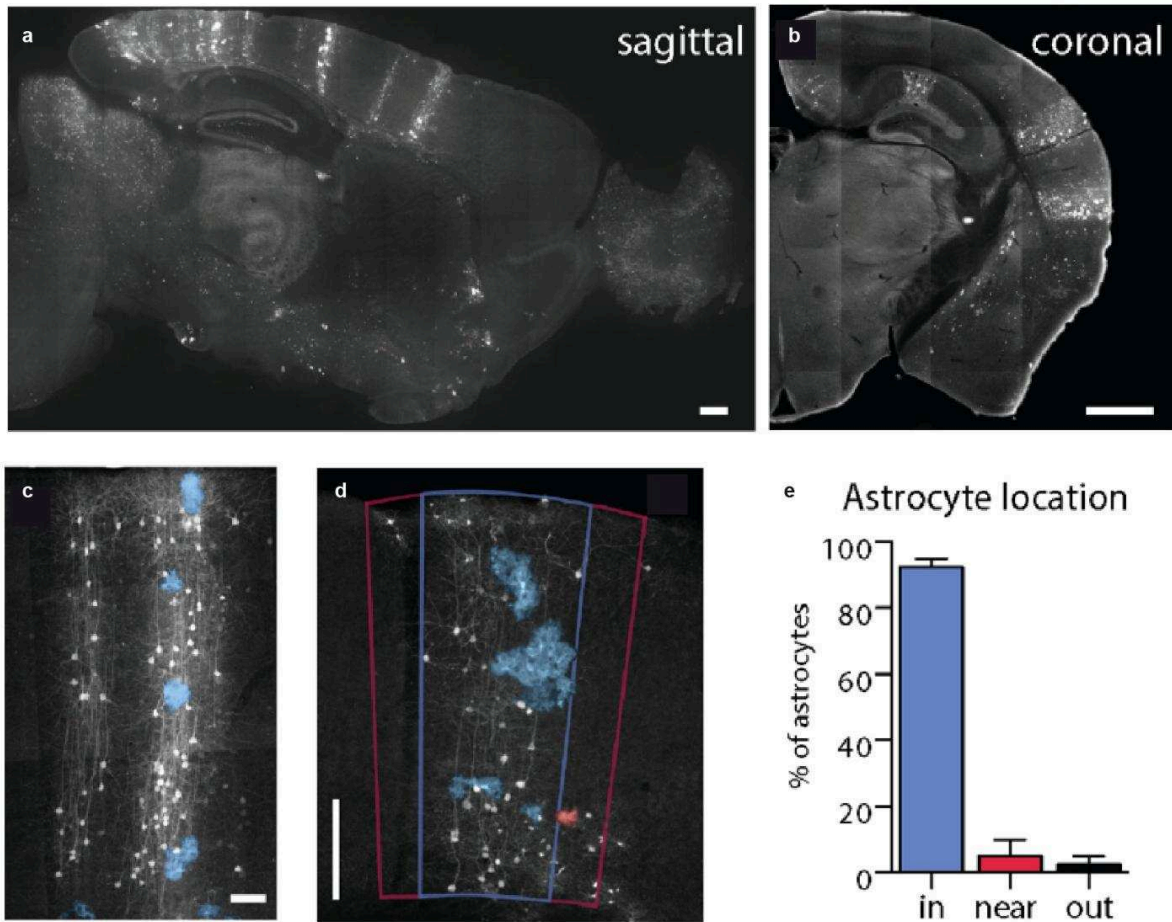


Figure 19. Génération coïncidente de neurones pyramidaux et d'astrocytes protoplasmiques dans des colonnes néocorticales.

Les souris TFC.09 x Z/EG adultes présentent des colonnes apparentes de cellules arrangées radialement à la fois le long des plans sagittal (a) et coronal (b). (c) Ces colonnes de cellules marquées avec la GFP (en blanc) contiennent à la fois des neurones pyramidaux et des astrocytes, qui ont été pseudocolorés en bleu à des fins de visualisation. (d-e) Des mesures ont été effectuées pour analyser si les astrocytes GFP+ étaient à l'intérieur (zone bleue, 92,6% des astrocytes), proches (à moins de 50 μ m, 6,1% des astrocytes, zone rouge) ou en dehors des colonnes GFP+ (1,7% des astrocytes).

Barres d'échelles : a-b : 500 μ m, d : 100 μ m, c : 50 μ m. (d'après Magavi et al., 2012)

(Rakic, 1988). Cependant, le processus de ce développement colonnaire des astrocytes est encore méconnu, en particulier, suit-il un schéma “inside-out” à l’instar des neurones ? De combien de cellules sont composées les colonnes ? De combien de progéniteurs uniques les cellules composant ces colonnes sont-elles issues ? Ces cellules ont-elles des relations fonctionnelles privilégiées ? Les travaux de Magavi et ses collègues d’une part suggèrent que les colonnes corticales sont composées de plusieurs groupes (ou clusters) d’astrocytes (Magavi et al., 2012), et les travaux d’Ichikawa et ses collègues d’autre part suggèrent que les astrocytes se développent dans le parenchyme cortical de la même manière que les neurones, suivant un schéma “inside-out” où les astrocytes nés en derniers se positionnent dans les couches les plus superficielles (Ichikawa et al., 1983). De plus les progéniteurs gliaux migreraient, à l’instar des neurones, le long de la glie radiaire (Zerlin et al., 1995), ce qui pourrait expliquer la formation des colonnes astrocytaires. Malgré ces quelques pistes, le développement et en particulier la migration des astrocytes corticaux demeurent globalement méconnus (Tsai et al., 2012). La voie de signalisation Ephrine,/Eph, impliquée dans la migration tangentielle neuronale (Dimidschstein et al., 2013) et étant exprimée également par les astrocytes dans plusieurs régions du système central chez la souris et l’Homme (Schmidt et al., 2007; Cahoy et al., 2008; Nikolakopoulou et al., 2016), pourrait elle également jouer un rôle la structuration du réseau astroglial ?

Si la maturation astrocytaire passe de manière évidente par une ou plusieurs phases de migration et de dispersion à l’échelle du réseau, cette maturation se produit également à l’échelle individuelle, sur le plan territorial (domaines astrocytaires) et morphologique.

3.5.2.2. Le développement des astrocytes à l’échelle de la cellule

Les astrocytes corticaux contactent les corps cellulaires neuronaux, mais aussi leurs dendrites, les épines dendritiques, et les terminaisons synaptiques (Ventura and Harris, 1999) à l’intérieur du territoire délimité par leur arborisation. Si Ramón y Cajal et d’autres avaient déjà observé la complexité de cette arborisation grâce, entre autres, aux colorations de Golgi (Ramón y Cajal, 1909; Kosaka and Hama, 1986), l’arborisation astrocytaire a longtemps été sous-estimée du fait de l’utilisation de marqueurs immunohistochimiques pour visualiser les astrocytes. En effet, pour beaucoup de ces marqueurs, tels que GFAP, S100 β , ou Aldh1l1, les fins

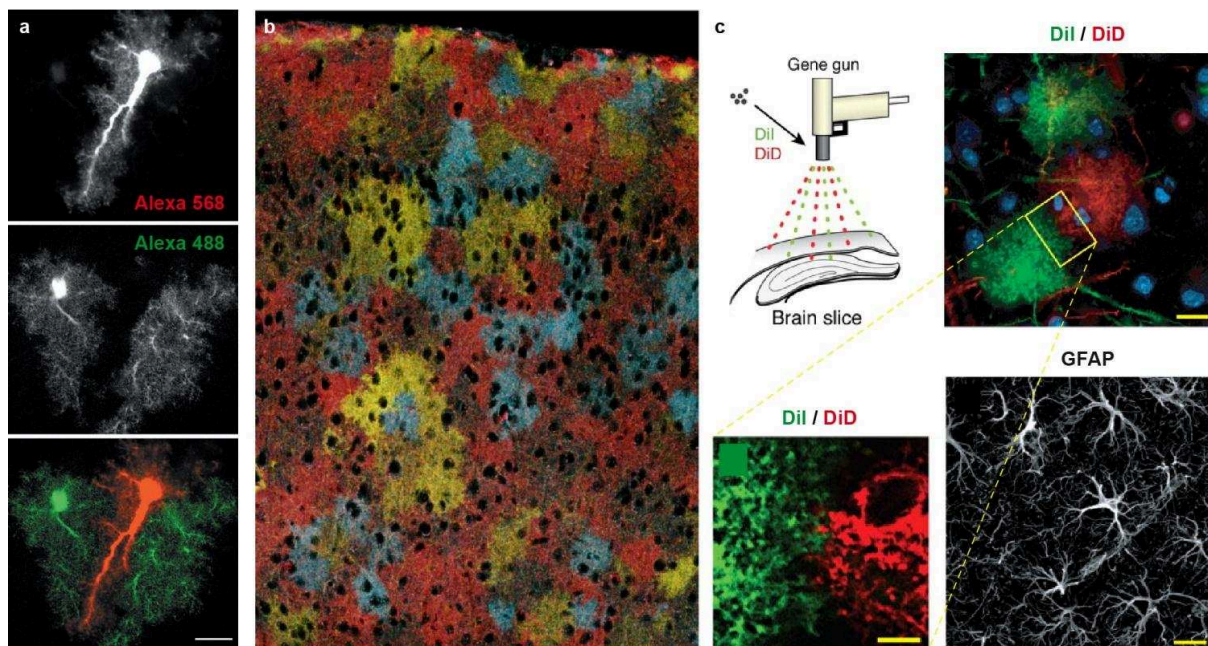


Figure 20. Les astrocytes occupent des territoires individuels distincts.

(a) La morphologie globale des astrocytes semble être fortement influencée par les astrocytes voisins dans le striatum murin. Une tranche optique à travers un astrocyte injecté avec de l'Alexa 568 et superposé avec les astrocytes remplis par de l'Alexa 488 dans la même tranche optique montre que l'astrocyte au milieu évite de faire chevaucher ses prolongements avec ceux de ses deux voisins. (d'après *Bushong et al., 2002*) (b) Le réseau astrocytaire continu et non chevauchant est bien visible dans le cortex cérébral murin d'une souris transgénique Brainbow adulte. (d'après *Livet et al., 2007*) (c) Procédure utilisée pour le marquage diolistique avec le Dil (vert) et le DiI (rouge) de tranches de cerveau permettant d'observer la structure buissonnante et les territoires définis des astrocytes individuels. L'immunomarquage contre GFAP dans le cortex montre que seuls les corps cellulaires et les principales ramifications des astrocytes corticaux sont GFAP+. (d'après *Oberheim et al., 2008*)

prolongements ne sont pas marqués (Bushong et al., 2002), voire leur marquage est dépendant de l'état réactif des cellules (GFAP par exemple), rendant difficiles les études morphologiques fines des astrocytes résidents (non réactifs). Il a été estimé que les immunomarquages GFAP révèlent au mieux 15% des volumes astrocytaires chez les rongeurs (Bushong et al., 2002). Avec l'utilisation de la GFP, en injections virales ou en lignées transgéniques, sous contrôle des promoteurs spécifiques tels que GFAP (Zhuo et al., 1997; Nolte et al., 2001), Aldh1l1 (Cahoy et al., 2008; Tsai et al., 2012) ou encore S100 β (Zuo et al., 2004) une visualisation à la fois du corps cellulaire et des nombreuses arborisations complexes des astrocytes est possible, et avec lui des études territoriales et morphologiques. Des microinjections de colorants différents dans des astrocytes individuels adjacents sur tranches montrent par exemple que les astrocytes hippocampaux sont organisés en domaines territoriaux distincts dont la morphologie, beaucoup plus étendue que ce qui était supposé auparavant, est largement influencée par celle des astrocytes voisins (Bushong et al., 2002) (Figure 20a). Ces domaines ne se superposent pas. En effet, la zone d'interface entre astrocytes est extrêmement limitée et les branches principales les composant sont rarement en contact avec les astrocytes voisins, contrairement aux fins prolongements spongiformes, non détectables avec le marqueur GFAP (Bushong et al., 2002). A l'intérieur de leur territoire, les astrocytes peuvent contacter jusqu'à 100 000 synapses chez la souris (Bushong et al., 2002). Cette absence de partage de domaine astrocytaire est confirmée par une autre étude utilisant l'expression de la GFP sous contrôle du promoteur GFAP (Halassa et al., 2007) qui montre également que les astrocytes peuvent coordonner des petits groupes de neurones lorsque les signaux sont propagés directement entre les astrocytes et les corps cellulaires neuronaux, et plusieurs centaines de neurones lorsque les signaux sont transmis des astrocytes aux dendrites, épines et synapses, avec une organisation en îlots synaptiques correspondant aux territoires individuels. Cette notion de microdomaines a par ailleurs été montrée dans la glie de Bergmann, suggérant un lien morphologie/fonction dans les interactions neurones-glie avec des microdomaines gliaux adaptés à la diversité fonctionnelle synaptique des cellules de Purkinje (Grosche et al., 1999). Des études plus récentes utilisant des stratégies multicolores montrent que cette organisation en domaines d'astrocytes est aussi retrouvée dans le cortex cérébral des rongeurs (Livet et al., 2007; Oberheim et al., 2008) (Figure 20b-c).

Contrairement à ce qui était supposé (Tout et al., 1993), les astrocytes n'occupent pas de manière homogène des régions sphériques du neuropil (Rohlmann and Wolff, 1996). En effet, si les premières études décrivant l'agencement des astrocytes dans la rétine entière chez le chat et le lapin évoquent déjà une morphologie adaptée aux prolongements neuronaux, passant de formes étoilées à des formes allongées (Karschin et al., 1986; Schnitzer and Karschin, 1986), d'autres études, présentent un réseau plutôt agencé de manière homogène chez le rat, où les astrocytes, espacés régulièrement, adhèrent à leurs voisins via leurs prolongements et repoussent même leurs corps cellulaires (Distler et al., 1991; Tout et al., 1993). Par ailleurs, les vaisseaux sanguins influencent l'organisation des prolongements astrocytaires et la morphologie générale des astrocytes, en particulier après lésion (Chan-Ling and Stone, 1991; Bardehle et al., 2013). Des travaux *in vitro* sur des astrocytes originaires du cortex de rat montrent également que dans une région définie, leurs morphologies sont variables en taille et en forme, avec des cellules d'aspect sphérique et d'autres plutôt allongées, permettant un remplissage continu du neuropil sans superposition de leurs arborisations (Bushong et al., 2002). Il n'y aurait pas de création d'espaces entre les cellules aboutissant à une répartition homogène comme suggéré antérieurement par des travaux effectués dans la rétine, une structure proche d'une organisation en deux dimensions (Tout et al., 1993), mais l'établissement et le maintien de territoires exclusifs (Bushong et al., 2002) ou avec un enchevêtrement limité à 4,6% de leur volume dans l'hippocampe, mais jusqu'à 50% dans le cortex cérébral du furet (López-Hidalgo et al., 2016) en trois dimensions (Ogata and Kosaka, 2002).

Dans certaines conditions pathologiques, notamment dans le cerveau épileptique, ou après une lésion, les astrocytes corticaux murins perdent leur disposition régulière et présentent des morphologies où les prolongements d'astrocytes voisins s'entremêlent, sans toutefois que cela soit nécessairement associé à une réaction de gliose (Oberheim et al., 2008). A l'inverse, une réaction de gliose avec augmentation de l'épaisseur des ramifications principales n'entraîne pas forcément l'agrandissement ou la désorganisation des domaines astrocytaires dans le cas de zones dénervées ou lésées (Wilhelmsson et al., 2006). L'établissement des domaines astrocytaires semble tout de même crucial au cours du développement cortical. Comment ces domaines sont-ils établis à l'échelle de la cellule lors de la

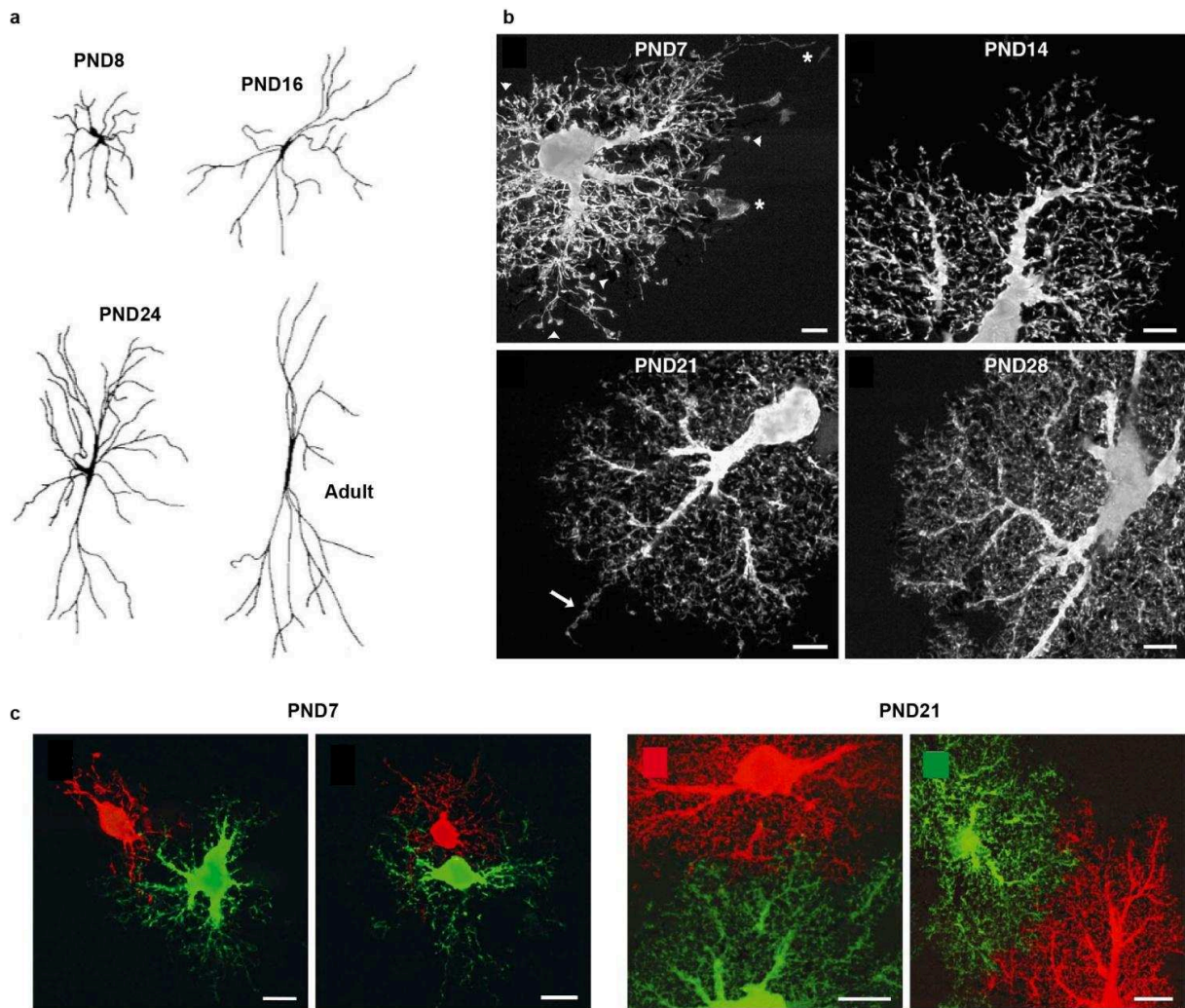


Figure 21. Morphogenèse des astrocytes au cours du développement.

(a) Dessins d'astrocytes hippocampaux de rat à partir d'immunomarquages anti-GFAP montrant une augmentation de la taille des astrocytes entre P7 et l'âge adulte. (d'après *Nixdorf-Bergweiler et al., 1994*) (b) Le marquage des astrocytes hippocampaux murins avec le colorant fluorescent jaune lucifer montre que le degré de ramifications astrocytaires visible sur les astrocytes protoplasmiques augmente au cours du développement (PND = postnatal day) qui se chevauchent tôt dans le développement, avant de former des territoires individuels (c) (d'après *Bushong et al., 2004*)

construction du réseau astrocytaire? Bien qu'incomplets, des marquages GFAP dans l'hippocampe de rat montrent déjà que les astrocytes augmentent largement leur taille dans les trois premières semaines postnatales (Nixdorf-Bergweiler et al., 1994) (Figure 21a). Une étude associant immunomarquages GFAP ou S100 β à des marquages intracellulaires avec le colorant fluorescent jaune lucifer sur des tranches de tissus fixés montre que, chez le rat, pendant la première semaine postnatale, les prolongements d'astrocytes hippocampaux voisins sont initialement entremêlés puis des domaines indépendants sont établis progressivement durant la seconde semaine postnatale avec l'élaboration de prolongements spongiformes formant des frontières entre domaines astrocytaires (Bushong et al., 2004; Freeman, 2010) (Figure 21b-c). Ce processus de ségrégation serait régulé par des mécanismes d'inhibition de contact (Distler et al., 1991). L'élaboration et l'affinement de l'arborisation astrocytaire s'achèveraient à des stades développementaux postnataux tardifs (un mois) et coïncideraient avec une période de synaptogenèse active au cours de laquelle les astrocytes jouent un rôle crucial (Freeman, 2010).

Les astrocytes protoplasmiques densifient leurs ramifications au cours du développement (Bushong et al., 2004) (Figure 21b). S'il a été documenté que les astrocytes protoplasmiques matures contiennent des centaines de fins prolongements (Tong et al., 2013) dont les plus petits contactent directement les synapses selon le modèle de la synapse tripartite (Reichenbach et al., 2010), les astrocytes protoplasmiques n'ont encore jamais été reconstruits intégralement. Cela s'explique d'une part par l'utilisation massive pendant de nombreuses années de marqueurs astrocytaires ne permettant pas de visualiser les cellules intégralement, mais également par la nécessité de pouvoir marquer des cellules isolées. Obtenir un marquage épars astrocytaire est aujourd'hui possible grâce à l'utilisation de lignées transgéniques Cre ou CreER dépendantes de promoteurs spécifiques ou via l'électroporation *in vivo* (*in utero* et postnatale) de vecteurs plasmidiques codant des protéines fluorescentes rapportrices permettant enfin modéliser ces cellules de manière à étudier le nombre, la densité, la taille et l'épaisseur de leurs branches, mais aussi le volume de ces cellules.

Le cortex cérébral est composé de neurones et d'astrocytes, dont on a abordé le développement au cours de cette introduction, mais il ne faut pas oublier que les astrocytes évoluent et mûrissent, à l'échelle du réseau et sur le plan morphologique,

dans un environnement où d'autres cellules co-existent et avec lesquelles ils interagissent, et dont les origines communes ne sont pas encore clairement établies.

3.6. La génération des autres types cellulaires du cortex cérébral

Parmi les autres types cellulaires du cortex cérébral, co-existent les péricytes et cellules endothéliales, les cellules épendymaires et d'autres cellules gliales comme les cellules NG2+, les microglies et les oligodendrocytes, et plus tardivement les cellules souches neurales adultes ou (cellules B1). D'où viennent ces différents types cellulaires ? Lesquels d'entre eux ont des origines communes aux astrocytes et à quels stades du développement du système nerveux ces lignages communs divergent?

Les cellules endothéliales et péricytes

Au cours du développement embryonnaire, la vascularisation du cortex cérébral est opérée par un processus d'angiogenèse c'est-à-dire par la formation de nouveaux vaisseaux à partir de cellules endothéliales préexistantes (ici depuis la vasculogenèse du plexus vasculaire primaire, à partir du mésoderme extra-embryonnaire, vers E7) (Patan, 2000). Elle commence avec l'invasion de vaisseaux sanguins depuis le plexus vasculaire péri-neural entourant le tube neural sur la surface piaie (Risau, 1992) et ce indépendamment de la migration neuronale (Stubbs et al., 2009). Après avoir émergé du plexus vasculaire péri-neural, les capillaires s'allongent radialement dans le parenchyme cortical, parallèlement aux cellules neuroépithéliales puis se ramifient dans d'autres directions après avoir atteint le ventricule (Paredes et al., 2018). Les vaisseaux sanguins peuvent également coloniser le cerveau depuis la zone périventriculaire (Vasudevan et al., 2008; Stubbs et al., 2009). Avec les péricytes, dérivant en majorité de la crête neurale (Armulik et al., 2011), les astrocytes et les microglies, les cellules endothéliales forment les unités neurovasculaires de la barrière hémato-encéphalique.

Les cellules microgliales

Les cellules microgliales sont les macrophages résidents du système nerveux central. Elles représentent environ 10 % des cellules gliales du cerveau et ont une origine extra-embryonnaire hématopoïétique (à partir du sac vitellin) (Alliot et al., 1999; Ginhoux et al., 2010; Schulz et al., 2012) à partir d'E8 chez la souris. Elles circulent ensuite à travers la circulation sanguine pour venir coloniser le cerveau

antérieur juste avant le début de la neurogenèse (E11,5). Les cellules microgliales commencent par s'accumuler à la surface piaie et au niveau du plexus choroïde avant de se répandre dans le parenchyme cortical (Swinnen et al., 2013). Elles interagissent avec les astrocytes en stimulant, entre autres, leur prolifération et/ou leur différenciation (Giulian et al., 1988; Nakanishi et al., 2007; Béchade et al., 2011; Antony et al., 2011).

Les cellules épendymaires et cellules souches neurales adultes (cellules B1)

Les cellules B1, situées dans la zone ventriculaire – sous ventriculaire, conservent des propriétés de cellules souches chez l'adulte (renouvellement et différenciation en types cellulaires variés) (Doetsch et al., 1999). En contact avec le ventricule latéral, elles sont entourées de cellules postmitotiques multiciliées formant l'interface cerveau – ventricule. Les cellules épendymaires et les cellules B1 sont les cellules gliales formant la niche neurogénique dans le cerveau du mammifère. Ces deux types de cellules dérivent des cellules de la glie radiaire à des stades embryonnaires tardifs (Merkle et al., 2004; Spassky et al., 2005; Fuentealba et al., 2015). Cependant les mécanismes de leur génération sont encore inconnus. En particulier, dérivent-elles de progéniteurs bipotents ou de cellules de la glie radiaire spécialisées à des temps précoces ? Cet aspect sera exploré au cours de ces travaux de thèse dans le cadre d'une collaboration avec Nathalie Spassky (Institut de Biologie de l'ENS, Paris).

Les cellules NG2+ et les oligodendrocytes

Les cellules NG2+ sont une population de progéniteurs gliaux des substances blanche et grise du système nerveux central mature et en développement des mammifères. Elles sont distinctes des astrocytes, des oligodendrocytes, des cellules microgliales et des cellules souches neurales (Nishiyama et al., 2014). Considérées comme les précurseurs d'oligodendrocytes (Bergles and Richardson, 2015), elles agrandissent leur population par auto-renouvellement et elles peuvent générer, mais pas seulement, des oligodendrocytes myélinisants ou non myélinisants avec un pic de prolifération au cours de la période périnatale. Dérivant en majorité des cellules progénitrices ventrales, elles apparaissent dans le parenchyme cortical après E15 chez la souris (Trotter et al., 2010). Les premières cellules générées au niveau des éminences ganglionnaires médianes migrent dorsalement et se dispersent dans le

néocortex tandis que celles générées plus tardivement à partir des éminences ganglionnaires latérales et médianes migrent vers les zones prolifératives du néocortex pour former la future zone sous ventriculaire (Anderson et al., 2001). Cependant, quelques cellules NG2+ dérivent également de la glie radiaire dorsale, comme le montrent des résultats obtenus avec des souris *Emx1CreER^{T2}* d'une part (Kessaris et al., 2006) et le marquage initial de cellules de glie radiaire détecté plus tard dans des cellules NG2+ des substances blanche et grise corticales d'autre part (Ventura and Goldman, 2007). Elles conservent leurs propriétés prolifératives chez l'adulte et pourraient être également à l'origine de 40% des astrocytes protoplasmiques de la substance grise du cerveau antérieur ventral (Zhu et al., 2007, 2011; Huang et al., 2014).

Les astrocytes corticaux sont donc liés, par leurs interactions ou leurs origines aux nombreux types cellulaires présents dans le cortex cérébral. L'origine commune des neurones, des astrocytes, de certaines cellules NG2+ et certains oligodendrocytes mais également des cellules épendymaires et des cellules B1 est de mieux en mieux établie, à savoir, les cellules de la glie radiaire. Cependant, la potentialité de ces cellules à générer un ou plusieurs de ces types cellulaires, simultanément ou par phases temporelles successives est encore méconnue et nécessite des études approfondies à l'échelle des progéniteurs individuels.

4. Méthodes de suivi du lignage cellulaire

Le neuroépithélium embryonnaire est composé d'une population apparemment homogène de progéniteurs qui génèrent néanmoins différents sous-types cellulaires neuraux avec des frontières spatiotemporelles définies. Les progéniteurs de la zone ventriculaire dorsale donnent naissance aux neurones formant les différentes couches corticales au cours de l'embryogenèse, puis engagent une phase gliogénique à la fin de l'embryogenèse. Pour mieux comprendre les étapes de la gliogenèse corticale, il est nécessaire d'explorer le comportement individuel des progéniteurs gliogéniques et de leur descendance au cours de la corticogenèse et pour cela utiliser les stratégies d'étude du lignage cellulaire qui fournissent des informations cruciales, à l'échelle des populations, mais également à l'échelle des progéniteurs individuels.

4.1. A l'échelle des populations

Le suivi du lignage cellulaire repose sur le marquage stable d'un progéniteur qui sera retrouvé dans toute sa descendance. Les études du lignage apportent des informations sur l'identité des cellules générées par le progéniteur ciblé, mais également leur nombre et leur positionnement. Si la notion de lignage existe dès le 19^e siècle avec des observations directes du développement d'embryons dépourvus d'amnios en microscopie optique (Conklin, 1906; Sulston et al., 1983; Kimmel et al., 1990), des expériences de transplantation (Spemann and Mangold, 1924) et l'utilisation de colorants divers comme les carbocyanines, les rhodamines, la fluorescéine ou la peroxydase de Raifort (Kretschmar and Watt, 2012), de nombreux travaux reposant sur l'expression de protéines rapportrices à partir de vecteurs plasmidiques (LacZ, protéines fluorescentes) introduits dans les cellules par injection, transfection, infection virale, lipofection ou électroporation ont été réalisés *in vitro* pour étudier le lignage cellulaire. Les stratégies *in vitro* présentent l'avantage de pouvoir sélectionner le type cellulaire étudié avec l'utilisation de mono ou co-cultures, permettant d'observer le développement de chaque type cellulaire dans un environnement contrôlé (stade de développement des cellules initiales, présence d'autres cellules, facteurs de croissances etc.). En ce qui concerne le cortex cérébral, une étude a notamment montré que des progéniteurs embryonnaires uniques en culture et imagés en temps réel produisaient d'abord des neurones, puis des cellules gliales (Qian et al., 2000).

Si les études du lignage cortical *in vitro* ont permis d'obtenir des données intéressantes, la culture cellulaire classique, essentiellement en deux dimensions, ne prend pas en compte la structure tridimensionnelle du cortex cérébral d'une part, parcouru par de nombreux vaisseaux sanguins avec lesquels les astrocytes interagissent, et celle des astrocytes eux-mêmes d'autre part, plats et bien moins ramifiés en culture qu'*in vivo* (Lange et al., 2012). De plus, ceux-ci apparaissent plus proches des astrocytes réactifs (exprimant fortement la GFAP) que des astrocytes corticaux en conditions physiologiques, introduisant probablement des biais en termes de prolifération et de différenciation. Pendant la gliogenèse, le milieu extracellulaire est également important pour la régulation de l'expression de certains gènes et facteurs de transcription et les astrocytes en culture voient celui-ci modifié (Cahoy et al., 2008), d'où la nécessité d'évoluer vers des études *in vivo* (Lange et al.,

2012). Comme les études *in vitro*, les analyses du lignage des progéniteurs corticaux *in vivo* reposent sur des marqueurs pouvant être insérés dans les progéniteurs corticaux à des stades embryonnaires définis, et transmis à leur descendance (Luskin et al., 1988). Ce type de marquage peut être obtenu par l'utilisation de lignées transgéniques ou des électroporations *in vivo*.

4.1.1. Les stratégies transgéniques

La compréhension du développement et de l'organisation du cerveau a longtemps été et est toujours liée aux outils technologiques permettant de visualiser des cellules individuelles, reposant sur la précision des méthodes de marquage (coloration de Golgi – LacZ – marqueurs antérogrades et rétrogrades – immunohistochimie etc.) et leur visualisation en imagerie (microscopie optique, électronique, à épifluorescence, confocale, multiphotonique etc.). L'utilisation de la protéine fluorescente verte de la méduse (Green Fluorescent Protein ou GFP) et de ses dérivées spectrales (YFP (jaune), RFP (rouge) et CFP (cyan) pour ne citer que les plus connues) a constitué une avancée majeure dans le domaine (Chalfie et al., 1994) pour marquer des cellules vivantes avec notamment la génération de lignées transgéniques chez de nombreuses espèces : *Caenorhabditis elegans*, la Drosophile, le poisson zèbre, la souris, le furet etc. (Feng et al., 2000). Si l'utilisation de promoteurs ubiquitaires (ROSA, CMV, CAG etc.) permet l'expression des protéines fluorescentes dans toutes les cellules, les lignées promoteur-spécifiques telles que GFAP-GFP (Zhuo et al., 1997; Nolte et al., 2001), Aldh1l1-GFP (Cahoy et al., 2008; Tsai et al., 2012) ou encore S100 β -GFP (Zuo et al., 2004) offrent la possibilité de ne visualiser que les populations astrocytaires. Les lignées transgéniques présentent également l'avantage d'avoir un marquage efficace à la fois du corps cellulaire et des nombreuses arborisations complexes des astrocytes. Cependant, ces stratégies basées sur l'expression de marqueurs tardifs (Aldh1l1 ou S100 β) ou exprimés de manière non homogène et peu spécifique (GFAP) sont incompatibles avec la discrimination fine de l'origine développementale des astrocytes corticaux.

Avec l'arrivée du système de recombinaison Cre-Lox, dérivé du bactériophage P1 (virus), et reposant sur l'utilisation d'une enzyme recombinase site-spécifique Cre (Hoess et al., 1984; Sauer, 1987; Sauer and Henderson, 1988), un nouvel outil d'ingénierie apparaît. La reconnaissance des paires de courtes séquences d'ADN

cibles appelées sites *Lox* par la Cre recombinase induit des délétions, insertions, translocations et inversions des séquences d'ADN situées entre ces sites (en fonction de l'orientation des séquences *Lox*) dans le génome des cellules. Depuis, de nombreuses lignées transgéniques de souris ont été générées. Les croisements entre des souris issues de lignées exprimant la *Cre* sous contrôle de promoteurs spécifiques ou ubiquitaires et des souris issues de lignées comportant des sites *Lox* encadrant des séquences cibles (comme les séquences STOP) en amont de séquences codant pour des protéines fluorescentes rapportrices permettent d'obtenir un marquage dans les cellules qui ont exprimé le gène régulé par le promoteur d'intérêt à un moment de leur développement. Les croisements de souris *RosaSTOPtdTomato* avec des souris *Emx1-cre*, *Dbx1-cre*, ou *Nkx2.1-cre* ont par exemple permis de montrer que les astrocytes sont distribués spatialement selon leurs domaines d'origine (Tsai et al., 2012).

Pour étudier le lignage cellulaire au cours du développement et/ou effectuer des expériences gain ou perte de fonction, le contrôle de l'activité de la Cre doit pouvoir être contrôlé dans le temps et dans l'espace. Cette version inductible du système Cre/Lox est obtenue avec l'utilisation d'enzymes recombinase Cre ligand-dépendantes, aussi appelées CreER (Feil et al., 1996, 1997, 2009). Il s'agit de protéines chimères formées par la Cre et d'un domaine de liaison aux hormones modifié (récepteur des œstrogènes). Physiologiquement, ce récepteur est présent dans le cytoplasme des cellules d'intérêt et il migre dans le noyau en présence d'œstrogènes pour venir se fixer sur l'ADN où il activera ses gènes cibles. Dans la construction CreER, la translocation vers le noyau est possible mais pas la fixation sur l'ADN et le récepteur a été modifié de telle sorte qu'il ne peut plus lier les œstrogènes endogènes mais uniquement un analogue structural pharmacologique, le tamoxifène. Ainsi, en présence de tamoxifène, administré par injection ou gavage, le récepteur quitte le cytoplasme pour rejoindre le noyau et la recombinaison, contrôlée dans le temps par l'expérimentateur, peut alors avoir lieu. Cette stratégie a par exemple permis de montrer la contribution postnatale de progéniteurs Nestin+ de la zone sous ventriculaire à la gliogenèse en utilisant des souris Nestin-CreER injectées au tamoxifène à la fin de l'embryogenèse (Burns et al., 2009).

Les souris transgéniques représentent donc un bon moyen d'étudier la contribution respective des populations cellulaires d'intérêt à la formation du cortex cérébral grâce à l'utilisation de promoteurs spécifiques, avec la possibilité de pouvoir déclencher le marquage et/ou d'effectuer des études de gain ou perte de fonctions dans le temps et dans l'espace. Cependant, les lignées transgéniques sont longues et coûteuses à générer alors que d'autres stratégies comme l'électroporation *in utero* permettent également le marquage de progéniteurs neuraux et de leur descendance née au temps de l'électroporation (vecteurs épisomaux) ou pendant plusieurs semaines (vecteurs intégratifs), mais aussi l'analyse rapide de mécanismes de régulation.

4.1.2. L'électroporation *in vivo*

Depuis son développement dans les années 2000, l'électroporation *in utero*, qui permet l'introduction de vecteurs ADN plasmidiques dans les progéniteurs neuraux, a été largement utilisée pour étudier le développement neuronal normal ou perturbé (Fukuchi-Shimogori and Grove, 2001; Saito and Nakatsuji, 2001; Tabata and Nakajima, 2001). En électroporant des plasmides codant des protéines rapportrices fluorescentes, il est possible de marquer les progéniteurs et les cellules qu'ils génèrent au moment de l'électroporation puis de les suivre à plus long terme (avant ou après la naissance). Chez la souris gestante anesthésiée, la méthode consiste, après laparotomie, à injecter des plasmides d'ADN au niveau des ventricules embryonnaires et appliquer un courant électrique modéré (30-50V) destiné à former des pores membranaires dans les cellules cibles (dans notre cas, les progéniteurs apicaux localisés dans la zone ventriculaire) et permettre aux plasmides d'ADN épisomaux (c'est-à-dire non intégratifs) de pénétrer dans les cellules cibles. Le développement des embryons électroporés se poursuit ensuite normalement. Les paramètres spatiaux peuvent être maîtrisés avec le choix du ventricule (latéral (pour le cortex cérébral notamment), 3^{ème} ou 4^{ème}) et l'orientation des électrodes, et également les paramètres temporels avec le choix du stade d'électroporation (typiquement entre E12 et E15 pour cibler les progéniteurs des neurones pyramidaux). La densité de marquage peut être également contrôlée en modulant la concentration des plasmides, sans toutefois pouvoir atteindre 100%. De plus, la technique permet de faire des manipulations génétiques aiguës des cellules

et d'étudier des mécanismes de migration et de régionalisation des neurones issus des progéniteurs électroporés (Bai et al., 2003; LoTurco et al., 2009).

Cependant, l'électroporation *in utero* de vecteurs plasmidiques épisomaux n'est pas adaptée à l'étude des populations astrocytaires car ces plasmides sont dilués au cours de la prolifération cellulaire et ne sont pas maintenus dans les cellules gliales générés de la fin de l'embryogenèse à plusieurs semaines après la naissance, soit bien après l'électroporation. De plus, les protocoles d'utilisation de la méthode imposent de respecter une fenêtre temporelle d'électroporation garantissant la survie des animaux (femelles gestantes et portées) aux alentours d'E12-E15, c'est-à-dire avant le début de la gliogenèse. Grâce à l'utilisation de systèmes de transposition, qui permettent l'intégration des plasmides au génome hôte en présence d'enzymes de type recombinase dénommées « transposases » (Kawakami and Noda, 2004; Sato et al., 2007; Kawakami, 2007), les analyses du lignage cellulaire à plus long terme deviennent possibles avec la co-électroporation *in utero* de vecteurs intégratifs (composés d'une séquence d'ADN codant une protéine fluorescente rapportrice encadrée par des séquences de transposition), et d'un vecteur codant la transposase associée (Tol2 ou PiggyBac (Lacoste et al., 2009; Sato et al., 2007; Yoshida et al., 2010)). Cette stratégie a permis de marquer efficacement et de manière stable les progéniteurs neuraux et leur descendance neuronale et gliale, mais aussi d'utiliser des promoteurs spécifiques comme GFAP et S100 β pour marquer des populations ciblées (Yoshida et al., 2010). L'utilisation de cette stratégie couplant électroporation *in utero* et vecteurs intégratifs a permis de montrer, par exemple que les cellules de la glie radiaire passent par une phase d'expression des antigènes GLAST+/Nestin+ avec une production préférentielle de neurones, puis par une phase GLAST+/Nestin- responsable de la production d'astrocytes (Siddiqi et al., 2014). L'utilisation de formes dominantes négatives ou constitutivement actives de protéines ou encore de shRNA offre également la possibilité d'utiliser les électroporations *in utero* pour étudier le développement cortical en conditions perturbées/pathologiques, ou l'implication de certains gènes dans la régulation du lignage cellulaire, de la prolifération, de la différenciation ou encore de la migration des cellules corticales.

Aux électroporations *in utero* s'ajoute la possibilité d'effectuer des électroporations postnatales (Boutin et al., 2008; Fernández et al., 2011) puisque la

période périnatale correspond à une phase de gliogenèse importante. Basées sur des protocoles similaires à l'électroporation *in utero*, elles peuvent se pratiquer avec des injections libres ou stéréotaxiques après anesthésie sur glace des souriceaux. Cependant, si les travaux de Goldman montrent une contribution des progéniteurs postnataux de la zone sous ventriculaire au réseau astroglial (Levison and Goldman, 1993), des électroporations postnatales effectuées chez la souris semblent indiquer le contraire (Ge et al., 2012). La question de la contribution de ces progéniteurs reste par conséquent encore à approfondir.

Les stratégies basées sur l'utilisation de lignées transgéniques ou sur des électroporations *in vivo* permettent donc d'étudier de manière fiable le lignage cortical en conditions normales ou pathologiques à l'échelle de populations dans leur intégralité (dense) ou de manière plus éparse. En revanche, elles n'apportent pas d'indication sur le lignage de progéniteurs individuels et leurs potentialités, ainsi que sur leur contribution individuelle à la formation du cortex cérébral. Pour obtenir ces informations, il faut pouvoir marquer un unique progéniteur (analyse clonale) ou plusieurs progéniteurs voisins avec des marqueurs différents (analyse multiclonale).

4.2. A l'échelle du progéniteur unique : les analyses clonales

Les analyses clonales des cellules corticales *in vivo* requièrent des marqueurs pouvant être insérés dans un progéniteur cortical unique à des stades embryonnaires définis, et transmis à toute la descendance issue du progéniteur ciblé. Elles nécessitent donc d'effectuer des marquages très épars ou très distincts. Les méthodes de transfert de gène par rétrovirus offrent cette possibilité et ont été beaucoup utilisés au début des analyses du lignage cellulaire, avant les stratégies multiclonales comme les barcodes et les méthodes multicolores.

4.2.1. Les injections virales

Les rétrovirus modifiés, incapables de se répliquer par eux-mêmes, utilisés dans le cas d'analyses clonales, infectent des cellules hôtes en division où ils s'intègrent au génome. Seules les cellules issues des progéniteurs infectés expriment les marqueurs utilisés, et le nombre de progéniteurs infectés est limité par l'utilisation d'un titre viral bas. Cette stratégie permet ainsi de faire des études clonales où un clone représente l'ensemble des cellules issues d'un progéniteur unique.

Les premiers résultats utilisant cette stratégie dans l'embryon murin montrent grâce au marquage LacZ que plusieurs types cellulaires ont des origines communes dans le cerveau, avec une restriction des potentialités au cours du développement (Sanes et al., 1986). Le gène *LacZ* d'*Escherichia coli* code pour l'enzyme β -galactosidase qui réagit en présence du composé X-gal par la production d'une coloration bleue. La méthode a été validée dans la rétine (Price et al., 1987; Turner and Cepko, 1987) et le tectum optique (Gray et al., 1988). Dans le cortex cérébral elle permet d'étudier la morphologie et la position de cellules sœurs après des injections virales dans le télencéphale embryonnaire murin. Les résultats initiaux montrent que, contrairement à ce qui a été montré plus récemment (Gao et al., 2014), les progéniteurs marqués à E12-E14 produisent des neurones ou de la glie mais pas les deux et que les lignages neuronaux et gliaux divergent ainsi avant ces stades développementaux (Grove et al., 1993; Luskin et al., 1988; McCarthy et al., 2001). D'autre part, les résultats provenant des injections rétrovirales ont généré des controverses toujours d'actualité : la potentialité des progéniteurs gliaux postnatals à générer à la fois des astrocytes et des oligodendrocytes est ainsi considérée nulle (Luskin, 1993; Luskin and McDermott, 1994) ou significative (15% des progéniteurs) (Levison and Goldman, 1993), suggérant une possible coexistence de progéniteurs bipotents et restreints (voir la revue de Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Par ailleurs Luskin et ses collègues montrent une différence d'organisation entre les clones neuronaux, agencés en colonnes traversant les différentes couches corticales, et les clones gliaux, avec des orientations plus variables (Luskin et al., 1988). D'autres études montrent également que ces clones neuronaux sont composés de cellules pouvant migrer le long de fibres radiales différentes (Walsh and Cepko, 1988) et même se disperser tangentiellement sur plusieurs centaines de micromètres (Walsh and Cepko, 1993). C'est aussi grâce aux injections rétrovirales que les progéniteurs de la zone sous ventriculaire postnatale ont été montrés donner naissance à des interneurons migrant jusqu'au bulbe olfactif (voir la revue d'Alvarez-Buylla and García-Verdugo, 2002) et à des précurseurs gliaux se différenciant en astrocytes et en oligodendrocytes dans les substances grises et blanches (Levison and Goldman, 1993; Parnavelas, 1999; Marshall and Goldman, 2002).

Ce type de stratégie a été utilisé plus récemment avec des injections de rétrovirus codant la GFP dans les progéniteurs corticaux situés dans la paroi des ventricules latéraux murins pour montrer que les neurones issus des cellules de la glie radiaire via des divisions symétriques et asymétriques (Noctor et al., 2004) établissent des unités radiaires dans le néocortex (Noctor et al., 2001) de 4 à 6 cellules (Yu et al., 2009). L'imagerie en temps réel sur tranches montre également que ces mêmes cellules de glie radiaire se différencient ensuite en astrocytes (Noctor et al., 2004, 2008).

Les analyses clonales par injections virales présentent un certain nombre de désavantages : avec quelques clones marqués au maximum par animal, très éloignés les uns des autres, elles obligent notamment les expérimentateurs à utiliser un grand nombre d'animaux et occultent très probablement les phénomènes rares. D'autre part, même l'utilisation de titres bas de rétrovirus contenant un gène rapporteur ne peut pas exclure la possibilité que deux progéniteurs voisins de la zone ventriculaire soient infectés et génèrent ainsi des analyses clonales biaisées. De même, des dispersions importantes de cellules issues d'un seul clone pourraient aboutir à l'interprétation erronée qu'il s'agirait de plusieurs clones. Des analyses clonales plus fiables nécessitent de faire appel à d'autres marqueurs, facilement identifiables, et permettant surtout de marquer de manière stable et claire plusieurs clones voisins.

4.2.2. Les stratégies multiclonales

Les analyses multiclonales ont été développées afin de marquer plusieurs progéniteurs au sein d'un même environnement (région cérébrale) pour visualiser les phénomènes rares, atténuer la variabilité et diminuer le nombre d'animaux utilisés. Plusieurs techniques permettent de marquer des clones multiples de manière distincte : les barcodes et les techniques multicolores.

4.2.2.1. Les barcodes

L'utilisation de vecteurs viraux avec des titres extrêmement bas contenant des étiquettes composées de séquences d'oligonucléotides pouvant être discriminées par réactions en chaîne par polymérase (PCR) sur cellules uniques a commencé il y a plus de vingt ans (Walsh and Cepko, 1992, 1993; Cepko et al., 1995). Depuis, des banques de rétrovirus ont été créées contenant jusqu'à 10^5 séquences de 24 paires

de bases : les barcodes. Grâce au grand nombre de marqueurs distincts, la méthode peut être appliquée sur des organismes entiers comme le poisson zèbre (McKenna et al., 2016). En combinant des barcodes associés à des protéines fluorescentes et des marqueurs immunohistochimiques, il devient possible d'imager les cellules fluorescentes, donc infectées par les injections rétrovirales, pour enregistrer leurs positions et identités cellulaires avant de récupérer l'information clonale par microdissection laser et PCR. Des cartes en trois dimensions regroupant les informations clonales, morphologiques et spatiales des cellules fluorescentes peuvent ainsi être construites. Cette stratégie a notamment permis de montrer que les interneurons clonalement reliés peuvent se disperser largement à travers des aires fonctionnelles et structurelles variées suggérant des mécanismes migratoires indépendants de leur origine clonale (Harwell et al., 2015; Mayer et al., 2015). Cependant des phénomènes d'extinction de gène et d'absence de détection des barcodes par PCR pouvant aller jusqu'à 40% des cellules microdisséquées (Harwell et al., 2015) peuvent biaiser les analyses clonales. D'autres marqueurs multiclonaux ont été développés, avec notamment les techniques multicolores permettant de visualiser des clones voisins, y compris en temps réel, compatibles avec l'utilisation de lignées transgéniques et ne requérant ni injections virales ni microdissection.

4.2.2.2. Les techniques multicolores

Les marqueurs multicolores, comprenant deux marqueurs ou plus sont de plus en plus utilisés pour le suivi du lignage cellulaire (Kretzschmar and Watt, 2012).

Les techniques bicolores

Les analyses mosaïques avec des doubles marqueurs vert et rouge (MADM) ont été utilisées pour la première fois pour caractériser la contribution de progéniteurs individuels aux différentes couches du cortex cérébelleux (Zong et al., 2005). D'autres techniques bicolores ont également été développées : la souris *mT/mG* Cre-dépendante et doublement fluorescente exprimant la Tomato à la membrane avant excision conditionnée par la Cre et la GFP à la membrane après excision (Muzumdar et al., 2007) ; des marqueurs combinant LacZ, la GFP et des systèmes de recombinaison (Nystul and Spradling, 2007; Yamamoto et al., 2009) et également des injections d'une combinaison de deux vecteurs viraux contenant la GFP et la RFP (Costa et al., 2009). Aujourd'hui cependant, c'est la technique MADM qui prédomine avec en perspective beaucoup de possibilités de manipulations

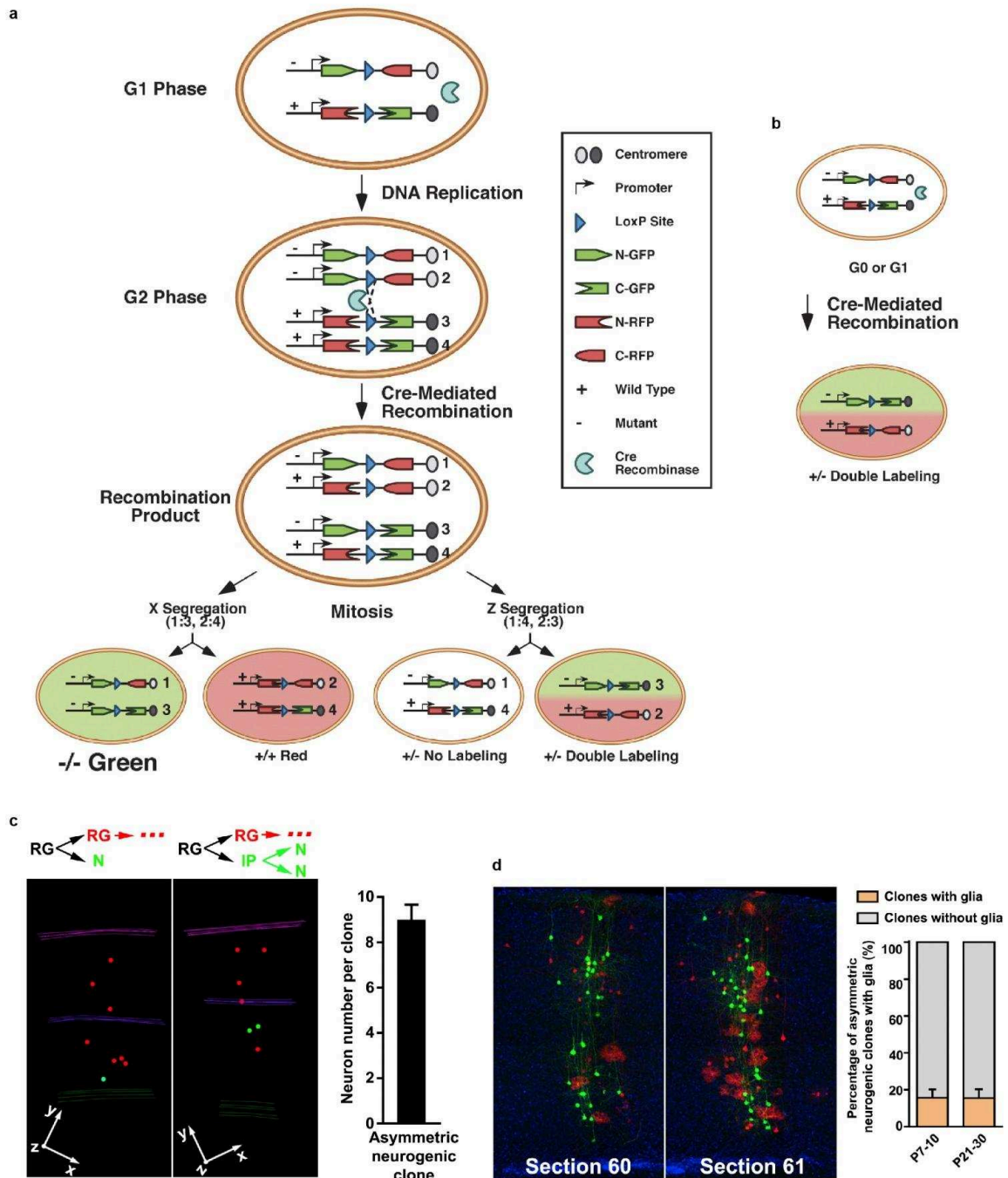


Figure 22. La stratégie de marquage mosaïque bicolore MADM.

(a) La recombinaison en phase G2, suivie de la ségrégation X, génère des cellules marquées individuellement au génotype altéré si la cellule d'origine est hétérozygote pour une mutation d'intérêt. La recombinaison en phase G2 suivie de la ségrégation Z génère des cellules incolores ou bicolores sans altération du génotype. (b) La recombinaison survenant dans les cellules en phase G1 ou postmitotiques (G0) génère des cellules bicolores sans altération du génotype. (d'après Zong et al., 2005) (c) Reconstruction 3D de clones prolifératifs asymétriques dans le cortex cérébral murin générés dans des souris *Emx1-CreER^{T2}/MADM*. Ces clones contiennent en moyenne 8-9 cellules. (d) Clone à P21 issu d'un progéniteur ciblé à E10 sur deux coupes adjacentes. Comme 1/6 clones issus de divisions neurogéniques asymétriques, il contient des neurones pyramidaux et de la glie. (d'après Gao et al. 2014)

génétiques permettant d'explorer les fonctions de multiples gènes d'intérêt (Beattie et al., 2017).

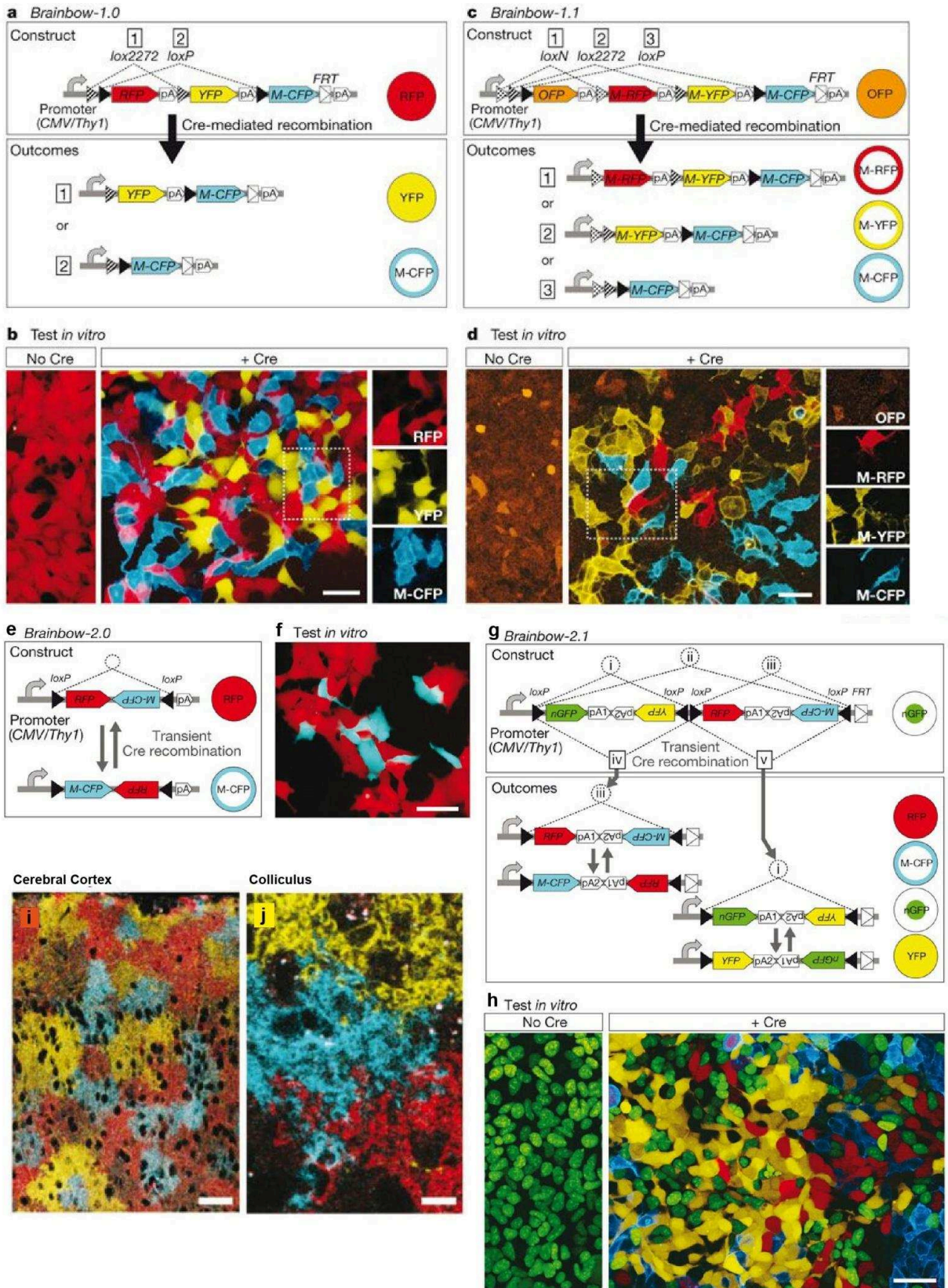
La méthode tire parti du système de recombinaison mitotique inter chromosomique Cre/Lox (Zong et al., 2005). Elle repose sur deux gènes marqueurs réciproquement chimériques qui ont été insérés par recombinaison homologue au niveau de loci identiques sur des chromosomes homologues (Figure 22a). Chaque gène chimérique contient une partie des séquences codantes de la GFP et de la RFP séparées par un site Lox. Lors de la phase G2 du cycle cellulaire, la Cre, introduite séparément, par croisement avec une lignée transgénique Cre ou Cre inducible par exemple, peut induire une recombinaison entre les sites Lox, restaurant la fonctionnalité des cassettes d'expression de la GFP et de la RFP. A la fin de la mitose, plusieurs options sont possibles : la ségrégation des chromatides sœurs se fait dans deux cellules filles différentes, aboutissant à l'expression de l'une des deux protéines fluorescentes (une cellule verte et une cellule rouge), ou bien la ségrégation se fait dans la même cellule fille, générant une cellule fille non capable d'exprimer l'une ou l'autre protéine fluorescente, et une exprimant les deux marqueurs (une cellule incolore et une cellule jaune). La recombinaison peut également avoir lieu en G0, en G1 ou dans des cellules post-mitotiques avec restauration de la GFP et de la RFP (cellule jaune). Un des chromosomes peut par ailleurs contenir une mutation d'intérêt, éloignée du site d'insertion par recombinaison homologue. Les processus successifs de recombinaison et de ségrégation peuvent donc générer des cellules homozygotes (sauvages ou mutantes) ou hétérozygotes pour la mutation en question, rendus visibles grâce à l'expression des protéines fluorescentes associées.

La stratégie MADM permet donc à la fois de marquer des cellules de manière clonale, puisque les cellules générées successivement après la recombinaison conservent les marqueurs des deux cellules filles d'origine, et d'effectuer des inactivations de gènes dans ces clones. Elle a été utilisée pour étudier le rôle des allèles maternels et paternels de certains gènes sur le développement cellulaire avec la création de disomies uniparentales (Hippenmeyer et al., 2013), identifier la cellule d'origine des gliomes comme étant un précurseur d'oligodendrocytes (Liu et al., 2011), ainsi qu'étudier la migration et la dispersion neuronales dans le cortex

cérébral (Hippenmeyer et al., 2010) et depuis les éminences ganglionnaires médianes (Mayer et al., 2015).

Cette technique a par ailleurs permis d'étudier finement le développement cortical à partir des cellules de la glie radiaire, grâce à sa résolution clonale (Gao et al., 2014). Les auteurs de cette étude montrent ainsi grâce à des croisements de souris *MADM* avec des souris *Nestin-CreER^{T2}* (Imayoshi et al., 2006) ou *Emx1-CreER^{T2}* (Kessar et al., 2006) qu'à partir de la phase neurogénique, ciblée grâce à des injections de doses très faibles de tamoxifène pour garantir un marquage épars, les cellules de glie radiaire individuelles produisent en moyenne 8 à 9 neurones distribués sur toute l'épaisseur corticale suggérant une production neuronale en unités radiaires, avec toutefois des formes clonales et dispersions variables (Figure 22b). De plus les observations des proportions de cellules vertes et rouges dans les clones bicolores montrent une majorité de clones issus de divisions symétriques prolifératives à E10, diminuant progressivement vers une totalité de clones issus de divisions neurogéniques asymétriques à E13. Ils montrent également qu'1/6 de ces cellules de glie radiaire neurogéniques génèrent aussi des cellules gliales (Figure 22c), incluant astrocytes et oligodendrocytes, mais qu'aucune n'est exclusivement spécifique des cellules gliales et que plus les clones sont grands, plus ils ont de chance de contenir de la glie. Un autre aspect intéressant de cette étude est la caractérisation de l'origine de ces cellules grâce à l'analyse de leur couleur : ainsi dans le cas des clones asymétriques neurogéniques, les cellules gliales partagent toujours la couleur de la majorité des neurones, indiquant une transition gliogénique à la fin de la neurogenèse, et une division neurogénique terminale de la cellule progénitrice restante.

La méthode *MADM* et notamment cette dernière étude ont accru notre compréhension du développement cortical. En revanche, ces travaux n'ont abordé que superficiellement la gliogenèse corticale, et n'apportent pas d'éléments nouveaux permettant de mieux comprendre l'organisation clonale des astrocytes et leur évolution au cours du temps. Une limite supplémentaire à la démocratisation de la stratégie *MADM* est la nécessité d'utiliser un grand nombre d'animaux pour obtenir un nombre de clones suffisant pour les analyses statistiques requises. De plus, *MADM* porte sur l'analyse de clones uniques et ne permet pas de renseigner sur la stéréotypie de comportement de plusieurs clones voisins, et leurs éventuelles



(légende sur la page suivante)

Figure 23. La stratégie multicolore Brainbow.

(a-b) Dans *Brainbow-1.0*, des paires incompatibles de sites lox s'alternent: la Cre choisit entre les événements d'excision 1 ou 2. Avant l'action de la Cre, seul le gène suivant le promoteur est exprimé (RFP). La recombinaison permet l'expression de la YFP (1) ou de la M-CFP (2) ici testé dans des cellules HEK transfectées avec *CMV-Brainbow-1.0*. (c-d) Dans *Brainbow-1.1*, une troisième paire de sites lox incompatibles (loxN) est ajoutée, créant trois possibilités de recombinaison (1, 2 ou 3), en passant de l'expression de l'OFP à l'expression de la RFP, YFP ou CFP. (e-f) Dans *Brainbow-2.0*, la Cre déclenche l'inversion d'un segment d'ADN flanqué de sites loxP dans une orientation opposée. Dans 50% des cellules, l'inversion devrait se terminer par une orientation antisens et changer l'expression du gène. (g-h) La construction *Brainbow-2.1* contient deux segments d'ADN inversables en tandem. Les événements de recombinaison d'inversion (i – iii) et d'excision (iv, v) créent quatre possibilités d'expression. (i-j) Dans la lignée *Thy1-Brainbow-1.1 M*, les astrocytes sont marqués avec trois protéines fluorescentes différentes et remplissent le cerveau de manière continue dans le cortex et s'entremêlent dans le colliculus.

Barres d'échelles : a-i : 50 μm ; j : 10 μm . (d'après Livet et al., 2007)

intercalations. Pour aborder ces aspects développement, il est donc nécessaire de se tourner vers les stratégies multicolores.

Les techniques multicolores

Le suivi du lignage cellulaire a pris de l'ampleur avec l'avènement des stratégies d'ingénierie génétiques reposant sur une combinatoire de marqueurs fluorescents dérivés de la GFP. La stratégie Brainbow a en particulier ouvert la voie aux études multicolores à grande échelle (Livet et al., 2007) (Figure 23). Utilisant le système de recombinaison Cre/Lox et ses mécanismes d'excision et/ou d'insertion d'ADN dépendant de la configuration de paires de sites lox incompatibles intercalant des séquences codant des protéines fluorescentes distinctes (initialement 3, RFP, CFP et YFP), cette stratégie permet d'exprimer de manière stochastique et à fréquences égales une combinatoire de marqueurs colorés résultant de l'expression d'une ou plusieurs protéines fluorescentes distinctes (en fonction du nombre de copies du transgène Brainbow présents dans la cellule cible). *Brainbow-1* utilise l'excision par la Cre entre des paires de sites lox incompatibles alternés pour créer un événement recombinatoire au hasard tandis que dans *Brainbow-2*, la Cre inverse des segments d'ADN délimités par des sites loxP en configuration opposée et positionnés en tandem pour générer plusieurs possibilités de recombinaison. Le marquage est stabilisé par des constructions empêchant d'effectuer des recombinaisons supplémentaires dans *Brainbow-1* (perte du site lox) ou l'utilisation de Cre à action transitoire qui s'excise elle-même (Silver and Livingston, 2001) dans

Brainbow-2. La palette de couleurs dépend ensuite du nombre de copies des transgènes (jusqu'à 10 combinaisons distinctes avec 3 copies contenant chacune 3 protéines fluorescentes), de l'efficacité et de la durée de la recombinaison mais aussi du promoteur utilisé. La technique a été utilisée pour visualiser des neurones adjacents et reconstruire plusieurs centaines d'axones voisins et leurs multiples contacts synaptiques dans un volume réduit mais aussi pour analyser les interactions gliales et en particulier pour montrer le réseau continu et non chevauchant des astrocytes corticaux (Livet et al., 2007). Depuis, de nombreux groupes ont tiré parti de cet outil puissant pour suivre l'organogenèse, le lignage cellulaire et tracer des axones pour ne citer que les principales applications, dans de nombreuses espèces différentes (voir la revue de Weissman and Pan, 2015).

Basée sur un transgène de type *Brainbow 2.1* sous promoteur CAGG et intégré au locus *Rosa26* (pour une expression ubiquitaire constitutive), la souris Confetti permet quant à elle l'expression stochastique de quatre protéines fluorescentes (GFP nucléaire, YFP, RFP et CFP) après recombinaison (Snippert et al., 2010) (Figure 24). Utilisée essentiellement dans des études de lignage des cellules souches de l'épithélium intestinal mais aussi dans d'autres structures, cette technique a également permis d'effectuer des analyses clonales d'astrocytes après lésion corticale en croisant des souris $GLAST^{CreERT2}$ avec des souris *R26R-Confetti* (Bardehle et al., 2013). Les auteurs de cette étude montrent que le recrutement d'astrocytes après une lésion corticale repose uniquement sur une prolifération très localisée. Ils observent par ailleurs des doublets unicolores, synonymes de division cellulaire, au niveau de la lésion après injection de tamoxifène, mais pas en l'absence de lésion. Avec un nombre de couleurs limité, cette approche peut donc être utilisée dans des tissus à faible dispersion cellulaire tridimensionnelle ou des tissus essentiellement en deux dimensions comme l'épithélium intestinal.

L'ensemble de ces méthodes transgéniques offre la possibilité d'étudier des aspects connectomiques (étude des connexions neuronales), le lignage global et des phénomènes prolifératifs isolés mais pour parvenir à identifier des progéniteurs voisins et leur descendance en milieu densément marqué, le nombre de marqueurs doit être augmenté. Des méthodes multicolores basées sur l'électroporation *in vivo* de multiples transgènes contenant chacun la séquence d'une protéine fluorescente différente, encadrés par des séquences de transposition et adressés à différents

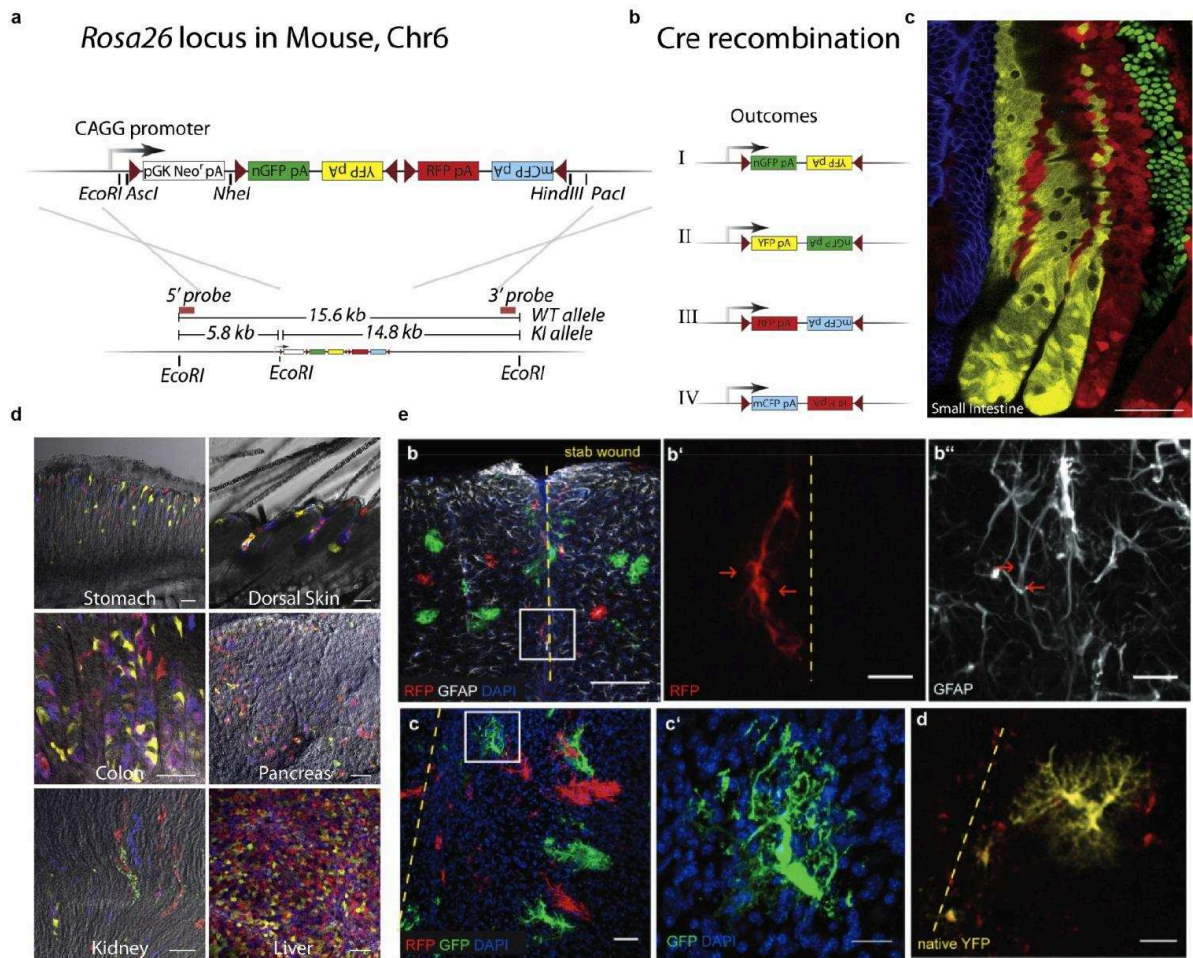


Figure 24. Analyses multiclonales avec la souris Confetti.

(a) Brainbow2.1 codant quatre protéines fluorescentes (Livet et al., 2007) a été inséré dans le locus *Rosa26* pour obtenir la souris *R26R-Confetti* par knock-in, sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CAGG. Un site *LoxP* et une cassette de résistance à la néomycine ont également été insérés. (b) Sous activation de la *Cre*, la cassette néomycine est excisée et les recombinaisons de Brainbow2.1 permettent l'expression aléatoire de la GFP nucléaire, la CFP membranaire ou les RFP et YFP cytoplasmiques. (c-d) La lignée *R26R-Confetti* donne un marquage multicolore dans de multiples tissus. Barres d'échelles : 50 μm sauf pour le pancréas, les reins et le foie : 100 μm (d'après Snippert et al., 2010) (d) Marquage de doublets unicolores de source clonale et issus de divisions cellulaires se produisant après une lésion corticale grâce aux souris transgéniques *GLAST/Confetti*. Barres d'échelles : b : 100 μm ; b'-d : 20 μm . (d'après Bardehle et al., 2013)

compartiments subcellulaires ont depuis été publiées : StarTrak (García-Marqués and López-Mascaraque, 2013; Martín-López et al., 2013; García-Marqués et al., 2014; Parmigiani et al., 2015; Figueres-Oñate et al., 2016; García-Marqués and López-Mascaraque, 2017) et CLoNe (Garcia-Moreno et al., 2014; Vasistha et al., 2015). Ces méthodes permettent de marquer des cellules progénitrices et leur descendance avec des marqueurs combinatoires multiples (dans le noyau et dans le cytoplasme).

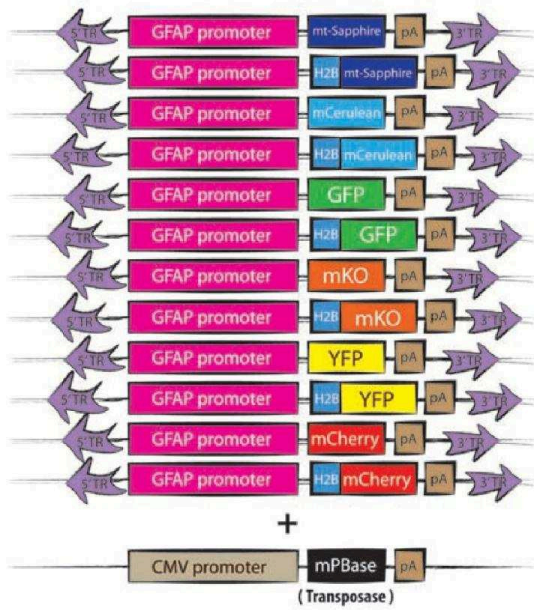
La méthode StarTrack (Figure 25a) montre notamment dans une première étude des clones corticaux presque exclusivement protoplasmiques ou fibreux (Figure 25b), suggérant qu'ils sont générés par des progéniteurs indépendants, mais aussi que les clones situés à proximité de la surface piale sont homogènes à 87.3%, avec un seul sous-type d'astrocyte pial (50.7%) ou protoplasmique (36.6%) représenté. Les auteurs concluent à l'existence de cellules progénitrices spécialisées pour l'un ou l'autre de ces sous-types d'astrocytes (García-Marqués and López-Mascaraque, 2013). Cependant, l'étude utilise pour l'analyse des clones une limite arbitraire de dispersion maximale de 300 μm et pour le marquage le promoteur GFAP pour contrôler l'expression de la protéine fluorescente rapportrice, qui n'est pas exprimé de manière homogène dans tous les astrocytes corticaux et donc ne ciblerait pas la totalité des astrocytes. Ces deux paramètres peuvent biaiser les analyses clonales avec une sous-estimation du nombre de cellules et de sous-types générés par clone. Avec cette stratégie, le même groupe montre d'une part que les clones d'astrocytes répondent aux lésions corticales de manière distincte en termes d'hypertrophie réactive et de prolifération (Martín-López et al., 2013), et confirme le lignage commun entre neurones et astrocytes d'autre part (Figueres-Oñate et al.,

Figure 25. Stratégies d'analyses multiclonales StarTrack et CLoNE.

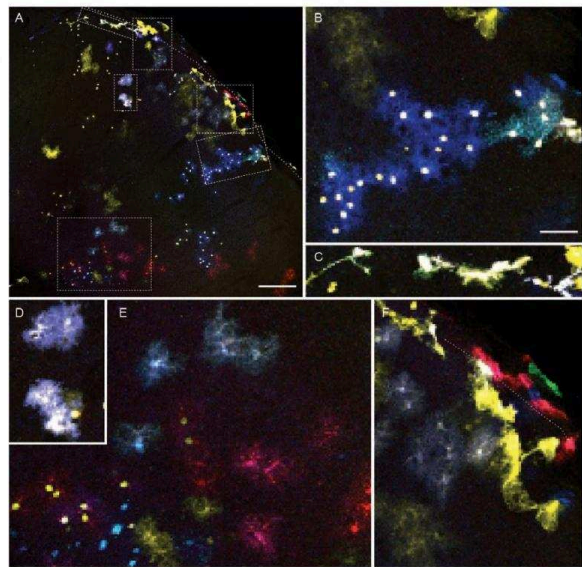
(a) La stratégie StarTrack utilise de multiples transgènes (12) encadrés par des séquences de transposition PiggyBac codant pour des protéines fluorescentes variées, sous contrôle du promoteur GFAP et adressées au noyau ou au cytoplasme. (b) Marquage multicolore et combinatoire d'astrocytes corticaux murins par électroporation *in utero* des marqueurs StarTrack et de leur transposase associée, la PiggyBac-ase. (d'après García-Marqués and López-Mascaraque, 2013) (c) Le marquage clonal avec CLoNE est basé sur un assemblage de trois différents types de vecteurs : marquage par expression de protéines fluorescente – cible utilisant la recombinase Cre sous promoteur spécifique – et intégration par transposase. 12 plasmides codant des protéines fluorescentes différentes sont utilisés pour marquer durablement les progéniteurs et leur descendance dans différents compartiments subcellulaires. (d) CLoNE permet de détecter des clones gliaux organisés en clusters plus ou moins dispersés à P15 via électroporation *in utero* des vecteurs CLoNE sous contrôle du promoteur *Emx2*. (d'après Garcia-Moreno et al., 2014)

StarTrack

a

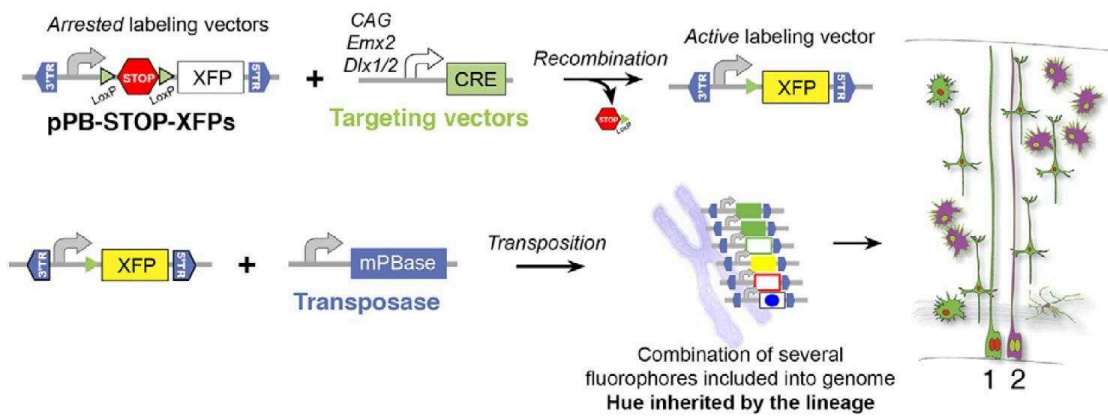


b

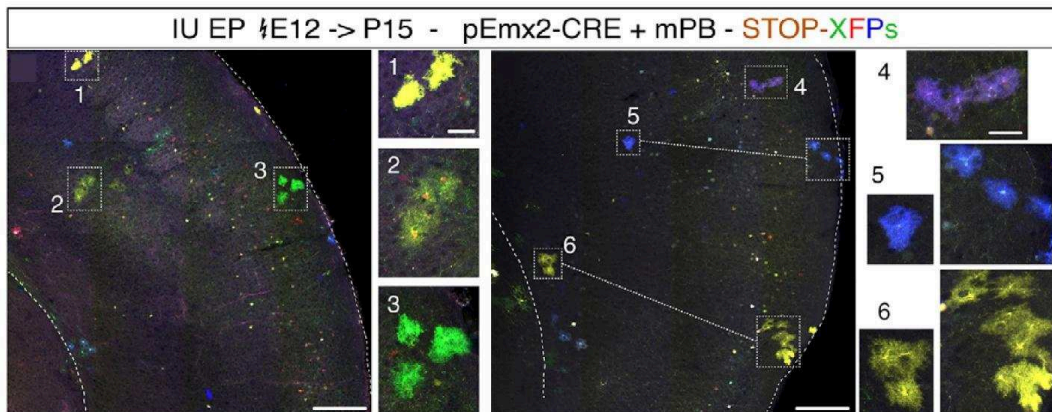


CLoNE

c



d



(légende sur la page précédente)

2016). La méthode CLoNE quant à elle a la particularité de dépendre d'un système de recombinaison Cre/Lox (Figure 25c) et montre, avec l'utilisation d'une Cre sous promoteur *Emx1*, un marquage astrocytaire dans le cortex cérébral avec une organisation en clusters ou plus dispersée, sans proposer d'analyses plus exhaustives (Garcia-Moreno et al., 2014) (Figure 25d).

Dans la pratique, les deux stratégies Startrack et CLoNE présentent une limitation technique importante : avec plus d'une copie des transgènes intégrées et donc le mélange des signaux fluorescents, la distinction de protéines fluorescentes dont les spectres d'excitation et d'émission sont proches voire chevauchants (GFP-YFP ou mKO-mCherry par exemple) est impossible si l'on veut pouvoir garder une large gamme de collection des longueurs d'ondes d'émission, et en particulier si i) l'excitation est simultanée, ce qui fait gagner du temps en imagerie et si ii) le nombre de copies intégrées est variable, ce qui est le cas avec les électroporations *in vivo*, entraînant des disparités d'intensité du signal plus difficiles à gérer en imagerie. L'interprétation des résultats utilisant ces stratégies est sujette à caution et il est donc nécessaire de se tourner vers une stratégie de marquage permettant d'augmenter le nombre de marqueurs facilement distinguables de manière non ambiguë par imagerie en utilisant pour cela un nombre restreint de protéines fluorescentes distinctes et un promoteur le plus ubiquitaire possible pour éviter des biais dans l'expression des protéines rapportrices.

Dérivés de la stratégie *Brainbow 1.1*, les transgènes multicolores intégratifs MAGIC Markers (Loulier et al., 2014) ont pour objectif de maximiser le nombre de marqueurs disponibles permettant de distinguer sans ambiguïté plusieurs clones voisins. Les stratégies MAGIC Markers reposent sur l'expression de quatre protéines fluorescentes distinctes placées sous contrôle du promoteur ubiquitaire CAG (Hitoshi et al., 1991) et présentant des spectres d'excitation et d'émission optimaux pour la récupération et la séparation du signal (Figure 26a). Le marquage combinatoire obtenu après recombinaison aléatoire des protéines fluorescentes est stable et transmis au cours des divisions cellulaires grâce aux séquences de transposition Tol2 ou PiggyBac flanquant les transgènes et permettant leur intégration au génome des cellules (Sato et al., 2007; Lacoste et al., 2009; Yoshida et al., 2010). De plus la densité et le stade de déclenchement (par électroporation *in utero*) du marquage sont contrôlés par l'expérimentateur qui définit à sa convenance la concentration

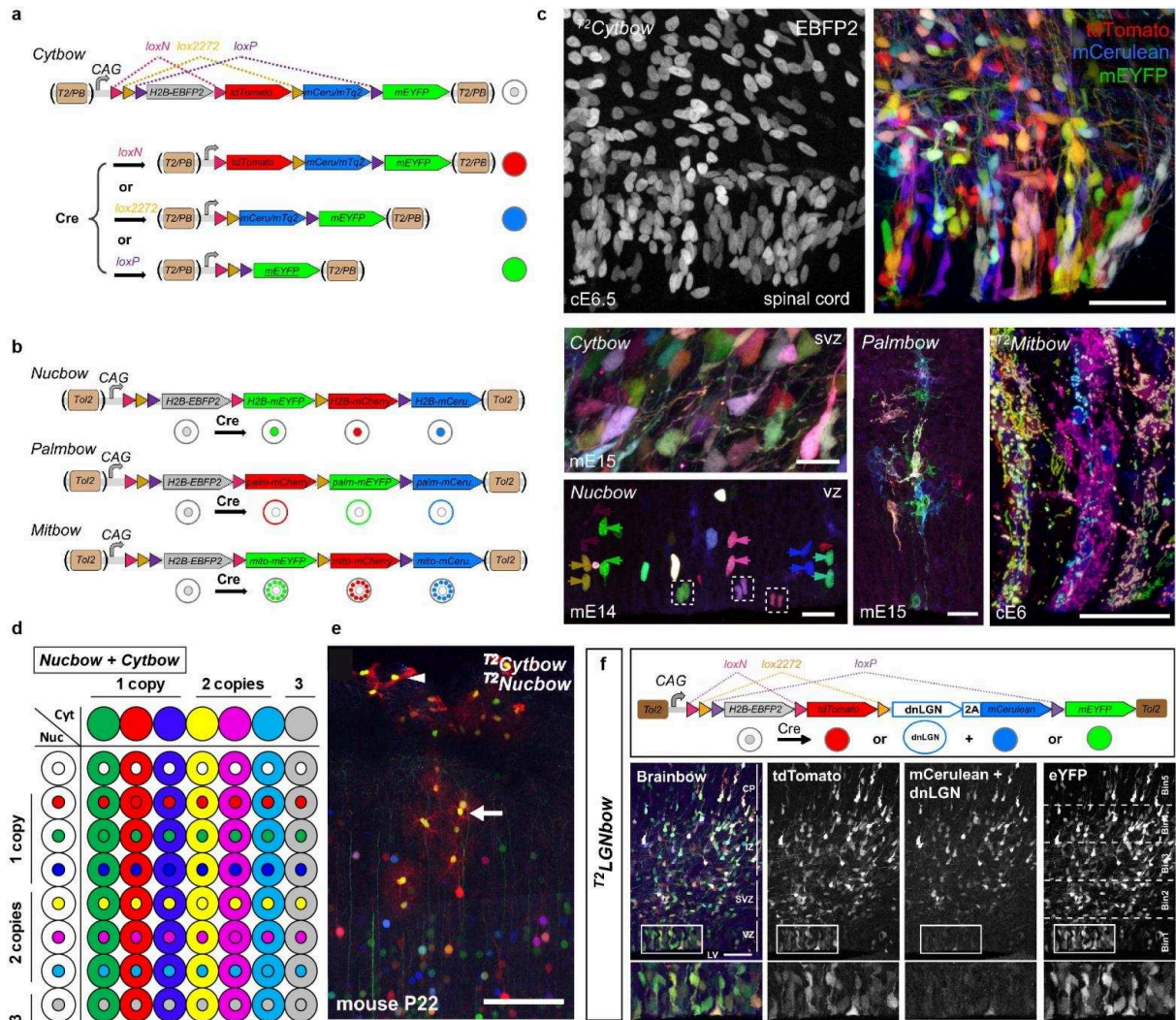


Figure 26. Les transgènes multicolores MAGIC Markers.

(a) Les MAGIC Markers expriment par défaut l'EBFP2 nucléaire sous le contrôle du promoteur CAG. Trois possibilités de recombinaisons sont créées par des paires alternées de sites *lox* incompatibles, chacune déclenchant l'expression d'une protéine fluorescente distincte : mCerulean/mTurquoise2 (mCeru/mTq2), mEYFP, or tdTomato/mCherry. Les séquences de transposition 5' et 3' Tol2 (T2) ou PiggyBac (PB) encadrent les transgènes pour les intégrer au génome. (b) Différentes versions des transgènes permettent d'adresser les protéines fluorescentes à différents compartiments subcellulaires : le cytoplasme (*Cytbow*), le noyau (*Nucbow*), la membrane (*Palmbow*) et les mitochondries (*Mitbow*), visibles par électroporations *in ovo* dans la moelle épinière de poulet ou *in utero* dans le cortex cérébral murin (c). (d) La palette de combinaisons de couleurs obtenue avec l'utilisation de ^{T2}*Cytbow* et ^{T2}*Nucbow* dépend du nombre de copies des transgènes présents dans la cellule. (e) Le transgène ^{T2}*LGNbow*, dérivant de ^{T2}*Nucbow* contient une cassette cyan modifiée qui exprime la forme dominante négative de LGN associée à mCerulean, grâce à une séquence peptidique de clivage 2A. L'électroporation de ^{T2}*LGNbow* dans les progéniteurs corticaux montre que la perturbation de l'orientation du fuseau mitotique (cellules bleues) favorise la production de glie radiaire externe par rapport à la glie radiaire apicale. Barres d'échelles : (c) haut : 50 μm ; (c) bas : 40 μm ; (e) 70 μm . (d'après Loulier et al., 2014)

plasmidique (densité de marquage) et le stade d'activation de la Cre (par électroporation *in utero* ou croisement de souris transgéniques et/ou injection de tamoxifène). Plusieurs versions des transgènes ont été générées en fonction de l'adressage des protéines fluorescentes à différents compartiments cellulaires (Figure 26b-c) : la membrane (*Palmbow*), les mitochondries (*Mitbow*), le cytoplasme (*Cytbow*) et le noyau (*Nucbow*) dont l'expression combinatoire augmente encore le nombre de marqueurs possibles (Figure 26d). Les transgènes MAGIC Markers expriment par défaut l'EBFP2 nucléaire dans les ultraviolets (Ai et al., 2007) en absence de recombinaison, puis, après recombinaison, les orange-rouge tdTomato ou mCherry (Shaner et al., 2004), le jaune mEYFP (Zacharias et al., 2002), ou les cyans mCerulean (Rizzo et al., 2004) ou mTurquoise2 (Goedhart et al., 2012), laissant le rouge lointain disponible pour des marquages immunohistochimiques. En utilisant, les stratégies MAGIC Markers qui permettent de marquer efficacement et distinctement des progéniteurs corticaux voisins et leur descendance neuronale et gliale, l'équipe a par ailleurs montré de manière préliminaire que deux sous-types d'astrocytes, protoplasmique et pial, ont un progéniteur commun (Loulier et al., 2014) (Figure 26e). De plus, la technique est compatible avec des analyses fonctionnelles permettant de créer des perturbations génétiques mosaïques en associant des formes dominantes négatives ou constitutivement actives de protéines candidates avec l'une des protéines fluorescentes rapportrices (Loulier et al., 2014) (Figure 26f).

Un des enjeux de l'étude du développement du réseau astroglial du stade progéniteur aux stades matures chez la souris par des stratégies de lignage multicolore est un challenge technologique. En effet, il s'agit d'imager une très grande structure, le cortex cérébral, contenant des cellules dont la dispersion est mal connue (les astrocytes) et qui sont elles-mêmes volumineuses (jusqu'à une centaine de micromètres de diamètre). Ce cortex cérébral est parsemé de cellules multicolores, retrouvées en environnement dense ou épars, exprimant une fluorescence endogène qui doit être conservée et dont les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission correspondant aux différentes protéines fluorescentes doivent être discriminées de manière optimale. L'imagerie d'échantillons corticaux comprenant des astrocytes marqués de manière multicolore doit donc répondre à des problématiques d'imagerie en couleurs et en grand volume.

5. Imagerie multicolore

Depuis la démocratisation de l'utilisation de marqueurs fluorescents, la microscopie optique à fluorescence n'a cessé de s'améliorer. Elle permet de visualiser des cellules ou des éléments intracellulaires marqués dans des tissus vivants ou fixés, de les suivre en temps réel et de détecter leurs potentielles interactions. Cependant, le contraste et la résolution offerts par cette technique diminuent avec la profondeur en raison des signaux provenant de l'extérieur du plan focal et les échantillons illuminés intensément sur une longue durée risquent un photoblanchiment et une phototoxicité des fluorochromes. Parmi les stratégies permettant de s'affranchir de ces inconvénients figurent entre autres les microscopies confocale et biphotoniques, mais aussi la moins conventionnelle microscopie à feuille de lumière.

5.1. Imagerie confocale

En microscopie optique à fluorescence classique, le signal émis par le plan focal, net, se perd dans le signal émis par les plans adjacents, flous. Elle est donc inadaptée aux échantillons épais. En revanche, la microscopie à balayage laser utilise une source de lumière à faisceaux laser (et non plus une lampe) ainsi qu'un diaphragme pour rejeter la lumière ne provenant pas du plan focal (Pawley, 2006). En déplaçant l'échantillon, l'imagerie d'une série de plans focaux successifs permet donc d'obtenir après empilement une image nette en trois dimensions. Le choix des lasers permet de contrôler les longueurs d'ondes d'excitation, correspondant à celles des protéines fluorescentes d'intérêt, et des filtres adaptés permettent de détecter les différents signaux avec des photo-multiplicateurs (PMTs), ou plus récemment avec des photo-détecteurs hybrides (gallium arsenide phosphide ou GaAsp (Fukasawa et al., 2008)). L'intensité lumineuse est mesurée et numérisée selon la position du laser dans le champ imagé pour obtenir une image numérique en niveaux de gris qui sera ensuite artificiellement colorée, permettant ainsi de superposer les images obtenues de manière séquentielle avec différents fluorochromes.

Avec leurs protéines fluorescentes aux spectres d'excitation et d'émission bien distincts (Figure 27), et l'utilisation d'un microscope confocal avec des lasers et des filtres appropriés disponible et utilisé en routine au laboratoire, la méthode de marquage multicolore MAGIC Markers permet d'imager et de tracer efficacement le

lignage de progéniteurs neuraux multiples (Loulier et al., 2014). Cependant, si l'imagerie confocale permet d'imager des échantillons biologiques vivants ou fixés à très haute résolution (quelques centaines de nanomètres), la taille du diaphragme étant très inférieure à celle du champ à imager, un balayage point par point est nécessaire pour obtenir une image du champ en question. Cela a pour conséquence une résolution temporelle limitée et des risques de photoblanchiment. D'autre part, les éléments biologiques ont généralement des coefficients d'absorption élevés dans les champs du visible et des ultraviolets, limitant la profondeur de pénétration à quelques dizaines de micromètres (Wimmer and Möller, 2010). L'utilisation de milieux de montage adaptés, avec un indice de réfraction idéal (1,45), et transparents, tels que le Vectashield, utilisé au laboratoire (Vector Laboratories) permet d'étendre cette pénétration jusqu'à 80 – 100 μm tout en préservant les protéines fluorescentes et les fluorochromes du photoblanchiment. Si cette méthode d'imagerie, couplée à des analyses sur coupes sériées mises bout à bout peut permettre d'effectuer des analyses clonales en volume, en conservant la possibilité d'utiliser des marqueurs immunohistochimiques (dont l'épaisseur de pénétration est limitée), l'imagerie de volumes continus nécessite de faire appel à d'autres stratégies, telles que la microscopie biphotonique ou à feuille de lumière.

5.2. Imagerie biphotonique

Développée en 1990 (Denk et al., 1990), la microscopie biphotonique remplace l'excitation par absorption d'un photon des lasers continus par l'excitation par absorption de deux photons simultanément des lasers femtoseconde. Il s'agit d'un système d'optique dit "non linéaire". Les deux photons vont combiner leurs énergies pour exciter des molécules telles que les protéines fluorescentes qui vont réémettre un seul photon. Les événements ainsi produits ne peuvent intervenir que là où la lumière est concentrée dans l'espace et dans le temps, c'est-à-dire dans le plan focal de l'objectif du microscope : la lumière d'excitation diffusée ne produit pas de bruit de fond, même en profondeur, jusqu'à environ 500 μm . Ces événements vont pouvoir être balayés sur un plan pour obtenir une image avec une résolution micrométrique. La focalisation et l'imagerie sur plusieurs plans successifs permet ensuite d'obtenir une image tridimensionnelle d'échantillons de l'ordre du demi millimètre d'épaisseur, soit bien plus qu'en microscopie confocale (linéaire).

Cette technique a été utilisée avec succès sur des échantillons multicolores

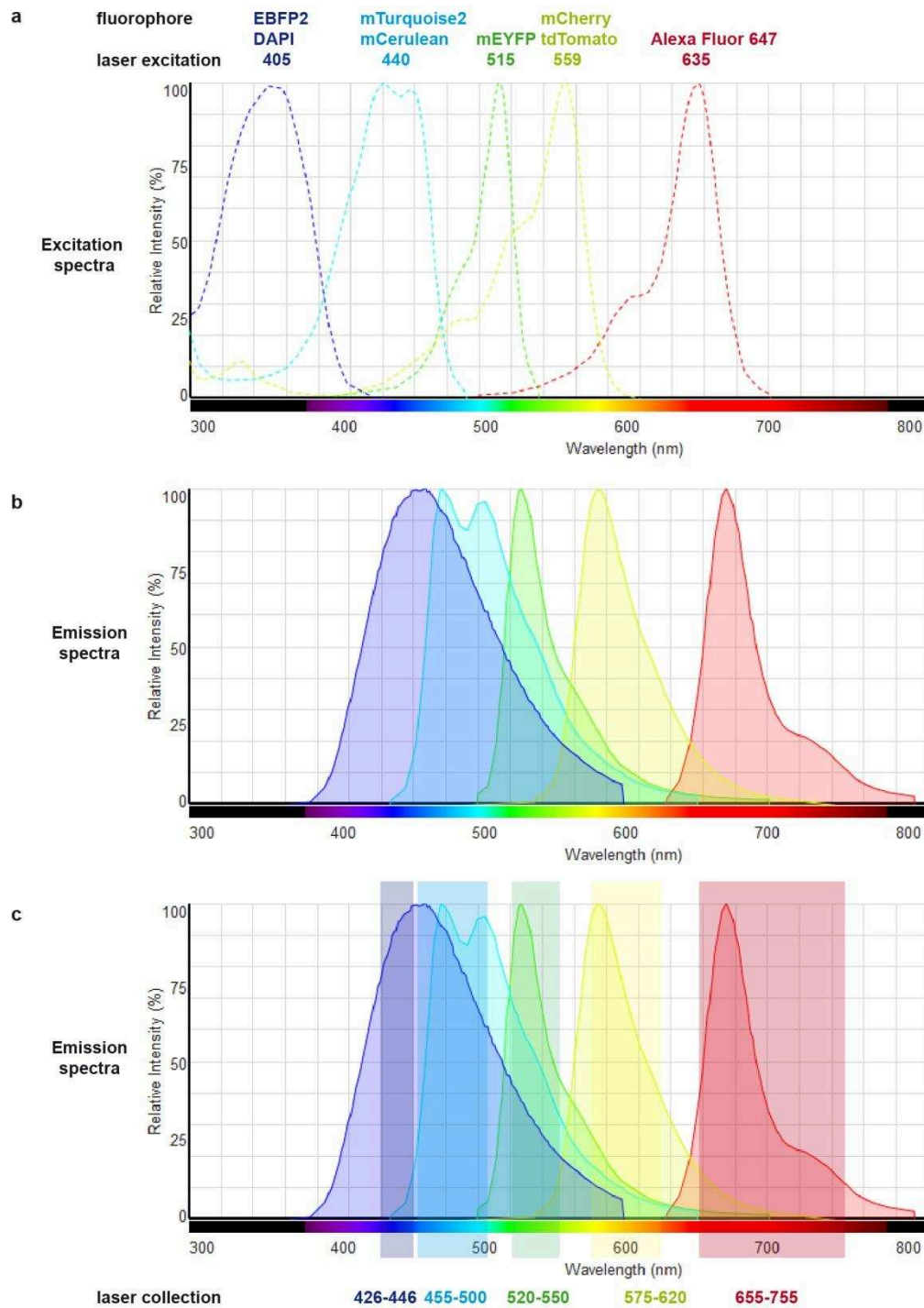


Figure 27. Spectres d'excitation et d'émission des fluorophores associés aux MAGIC Markers.

Spectres d'excitation (a) et d'émission (b) des protéines fluorescentes et fluorophores associés aux MAGIC Markers : ultraviolet, cyan, jaune, rouge et infrarouge, ainsi que les longueurs d'ondes d'excitation et filtrées avec notre dispositif d'imagerie confocale. (c) Longueurs d'ondes filtrées. Sont représentés ici DAPI, CFP, YFP, DsRed et l'Alexa Fluor 647. (*images modifiées d'après ThermoFisher SpectraViewer*)

préparés par l'équipe dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe d'Emmanuel Beaurepaire (Ecole polytechnique, Palaiseau) (Mahou et al., 2012) (Figure 28). L'excitation simultanée de trois protéines fluorescentes différentes est obtenue grâce à la superposition spatio-temporelle d'impulsions femtosecondes infrarouges synchronisées à des longueurs d'ondes distinctes (850 et 1100 nm pour exciter le bleu et le rouge). La synchronisation de ces deux impulsions (850 et 1100 nm) donne accès à une troisième longueur d'onde d'excitation "virtuelle" (959 nm) adaptée à l'excitation des protéines fluorescentes jaunes et vertes, permettant ainsi de visualiser des échantillons multicolores fixés ou vivants, de segmenter les cellules et d'effectuer des analyses colorimétriques (Mahou et al., 2012; Loulier et al., 2014 Abdeladim et al., en révision). Par rapport à d'autres stratégies biphotoniques telles que l'excitation de multiples fluorochromes avec une seule longueur d'onde ou l'illumination séquentielle à trois longueurs d'onde (Lansford et al., 2001; Dunn et al., 2002), celle-ci présente l'avantage de pouvoir contrôler de manière efficace et indépendante la puissance des trois signaux et de réduire les temps d'acquisition. Cette stratégie peut également être adaptée à l'imagerie à feuille de lumière, qui présente surtout l'avantage d'aller au-delà de la limite des 500 μm d'épaisseur, avec des temps d'acquisition largement diminués.

5.3. Imagerie à feuille de lumière

L'imagerie à feuille de lumière répond à des enjeux, entre autres, de vitesse d'imagerie élevée sur champs larges, de photoblanchiment et de phototoxicité limités et de bonne résolution en trois dimensions (Lemon and Keller, 2015). Idéale pour les très grands volumes, elle nécessite souvent que les échantillons soient rendus transparents par divers procédés chimiques.

5.3.1.Principes de l'imagerie à feuille de lumière

La microscopie de fluorescence à feuille de lumière consiste à illuminer un plan d'un échantillon perpendiculairement à l'orientation du dispositif de détection du signal pour obtenir une image de ce plan (Girard and Forget, 2011). Un sectionnement optique est effectué en superposant le plan focal du système de détection à celui de la feuille de lumière et des images en trois dimensions sont obtenues en empilant les images de chaque plan. La technique est par ailleurs compatible avec des échantillons multicolores grâce à des sources de lumière de

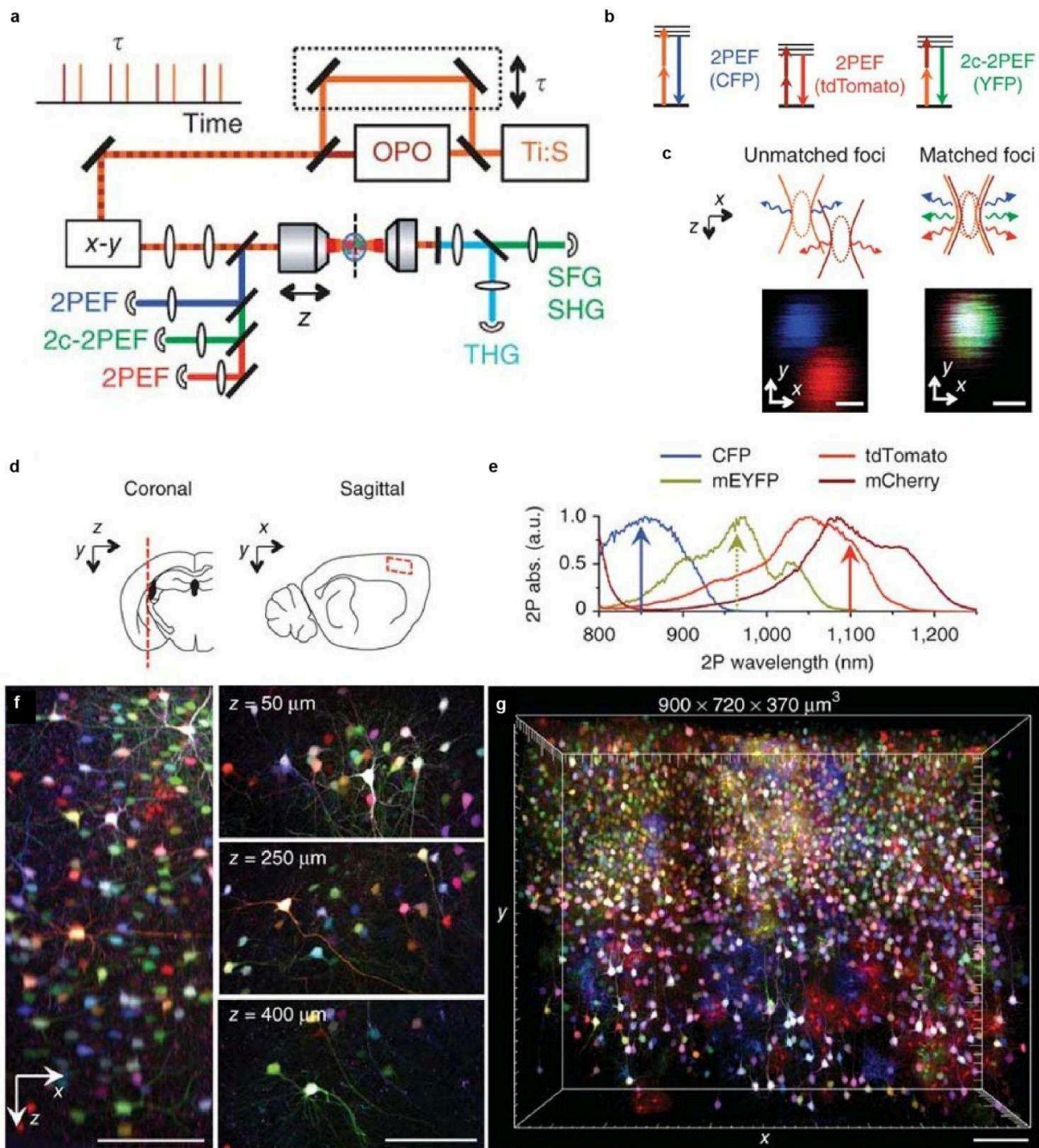


Figure 28. Imagerie biphotonique multicolore par mélange de longueurs d'ondes.

(a) Dispositif d'imagerie : des impulsions provenant d'un laser femtoseconde (Ti:S) et d'un oscillateur paramétrique optique femtoseconde (OPO) sont synchronisés avec une ligne de retard (τ) et coalignés dans un microscope. L'excitation avec des impulsions non synchronisées permet de récupérer le signal émis par les protéines fluorescentes bleues et rouges (2PEF), ainsi que les générations de seconde et troisième harmonique (SHG et THG). (b) La synchronisation par impulsions donne en outre accès à des processus à deux faisceaux, tels que la génération de fréquences totales (SFG) et la fluorescence à deux photons excités bicolore (2c-2PEF). (c) Effet du chevauchement temporel et spatial des impulsions sur 2c-2PEF. (d) Imagerie d'une région du cerveau murin adulte. (e) Spectres d'excitation biphotonique des protéines fluorescentes codées par les constructions Brainbow : mCerulean (CFP), mEYFP, tdTomato et/ou mCherry. (f) Images multicolores extraites d'une pile d'images de 450 μm d'épaisseur dans un cortex cérébral murin électroporé avec les transgènes Brainbow. (g) Vue tridimensionnelle d'un volume de $900 \times 720 \times 370\text{-}\mu\text{m}^3$ de tissu cortical multicolore imagé avec les impulsions synchronisées 850- and 1,100-nm.

longueurs d'onde différentes ou à un système d'excitation biphotonique (Mahou et al., 2014). Avec un système de détection basé sur celui des microscopes à épifluorescence classiques, l'imagerie, effectuée avec une caméra, est très rapide, ce qui présente un grand avantage sur des volumes importants et explique en partie la popularité croissante de cette technique. Malheureusement les tissus sont généralement opaques (diffusants et absorbants), empêchant l'éclairage et la détection en profondeur. Cependant, une des caractéristiques principales de cette méthode est la possibilité d'acquérir des images d'un même échantillon sous différents angles et orientations d'illumination avec de multiples objectifs disposés autour de l'échantillon, ou avec un échantillon mobile (Huisken, 2004; Huisken and Stainier, 2007; Becker et al., 2008). Toutes les images sont ensuite fusionnées pour améliorer la qualité du rendu en trois dimensions. En revanche, afin d'imager des organes entiers en profondeur et non plus seulement des petits volumes ou des coupes histologiques, rendre transparents les échantillons devient nécessaire.

5.3.2. Techniques de transparençation

Les tissus biologiques contiennent à la fois de l'eau, des protéines et des lipides, et présentent des indices de réfraction non homogènes ce qui rend les tissus absorbants et diffusants (Vigouroux et al., 2017). L'imagerie en profondeur sur tissu opaque est donc problématique (Richardson and Lichtman, 2015; Seo et al., 2016). Pour réduire l'absorption de la lumière, il faut homogénéiser les indices de réfractons à l'intérieur des échantillons en enlevant les lipides et en utilisant un milieu d'immersion dont l'indice de réfraction est proche de celui des protéines. Si les techniques permettant d'effectuer de telles modifications connaissent un formidable essor ces dernières années, l'idée n'est pas nouvelle puisque la première solution organique de transparençation a été développée il y a plus d'un siècle (Spalteholz, 1914). Depuis les années 2000, de nombreuses méthodes ont été publiées.

Ces méthodes peuvent être classées en deux grandes catégories (Figure 30) : les techniques à base de solvants organiques et celles à base d'agents hydrophiles. Les premières regroupent le BABB (Spalteholz, 1914) et les techniques de type DISCO (Ertürk et al., 2012; Belle et al., 2014; Renier et al., 2014; Pan et al., 2016) auxquelles nous avons accès au laboratoire. Cette méthode consiste à déshydrater les échantillons dans des bains de plus en plus concentrés de tétrahydrofurane sous agitation, puis à les délipider dans le dichlorométhane et pour finir à les décolorer

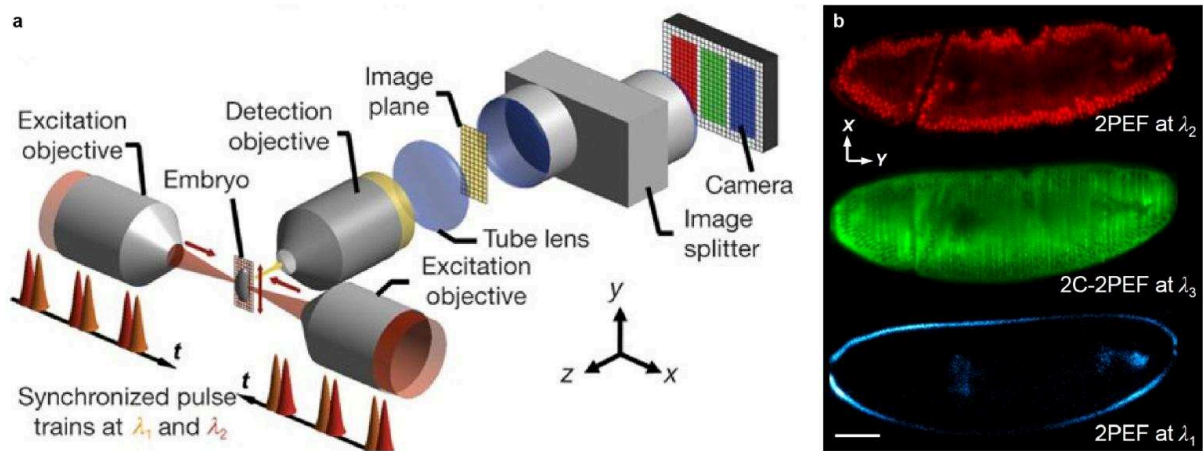


Figure 29. Microscopie à feuille de lumière biphotonique multicolore.

(a) Dispositif optique d'un microscope biphotonique à illumination bidirectionnelle sur plan sélectif (2P-SPIM). Deux impulsions femtosecondes ($\lambda_1 = 820\text{--}840\text{ nm}$ and $\lambda_2 = 1,090\text{--}1,175\text{ nm}$) sont balayées verticalement aux foyers de deux objectifs à faible ouverture numérique (NA) pour créer une illumination bidirectionnelle. L'image est collectée par un objectif de détection orthogonale et les composantes spectrales sont séparées spatialement sur une caméra à dispositif à transfert de charge (EMCCD) par un séparateur d'images. (b) Imagerie biphotonique simultanée de la RFP (noyaux) et la GFP (membranes plasmiques) dans un embryon de drosophile en phase de gastrulation montrant un signal endogène bleu provenant du vitellus et de la membrane vitelline. (d'après Mahou *et al.*, 2014)

dans le dibenzylether dans lequel ils seront imagés (Belle et al., 2014). Les secondes peuvent être divisées en plusieurs catégories : i) à inclusion en hydrogel avec CLARITY (Chung and Deisseroth, 2013), PACT/PARS (Yang et al., 2014; Treweek et al., 2015) et SWITCH (Murray et al., 2015) où les échantillons sont inclus dans de l'hydrogel et les lipides retirés avec du détergeant ou par électrophorèse. L'imagerie est ensuite réalisée dans des milieux de montages spécifiques pour homogénéiser les indices de réfraction. Ces protocoles souvent longs et nécessitent parfois du matériel spécifique et onéreux ; ii) en immersion simple en adaptant l'indice de réfraction à celui de l'échantillon grâce à un milieu spécifique comme le glycérol, le 2,2'-Thiodiethanol (Staudt et al., 2007) ou le fructose avec SeeDB (Ke et al., 2013; Ke and Imai, 2014) qui consiste à incuber les échantillons dans des bains de plus en plus concentrés de fructose (jusqu'à 80% dans la solution finale) + 0,5% α -thioglycerol sous agitation et à température ambiante; et iii) par hyper-hydratation en enlevant les lipides avec des détergents puis du sucrose ou de l'urée avec CUBIC (Susaki et al., 2014, 2015) et Scale (Hama et al., 2011). Ici, Le protocole simplifié que nous utiliserons consiste à incuber les échantillons dans 34% de N,N,N',N'-Tetrakis(2-hydroxypropyl)ethylenediamine, 15% de triton et 51% d'eau à 37°C sous agitation, avec renouvellement régulier de la solution.

Les techniques se sont aujourd'hui multipliées pour imager des gros échantillons, d'organes murins aux embryons humains (Belle et al., 2017) et même jusqu'aux animaux entiers (comme la souris ou le rat) (Tainaka et al., 2014; Bozycki et al., 2018). Reste à savoir lesquelles de ces techniques préservent la structure des tissus et la fluorescence endogène obtenue avec le marquage MAGIC Markers sur le long terme. En effet, si certaines de ces méthodes sont considérées comme n'altérant pas la fluorescence endogène, cela a généralement été établi en utilisant la GFP ou la YFP, des protéines fluorescentes beaucoup plus stables que les protéines cyan comme mCerulean/Turquoise2 par exemple.

Grâce aux différentes techniques d'imagerie à notre disposition, confocale – biphotonique – à feuille de lumière, l'imagerie en petits et grands volumes et à résolution subcellulaire sur échantillons de cortex cérébral multicolores non traités ou transparisés devient envisageable, ouvrant la voie aux analyses multiclones à grande échelle mais dont les protocoles restent à adapter à de nombreux paramètres : volume, transparence et rigidité du tissu, longueurs d'ondes souhaitées,

Solvent-based clearing		Reference
		BABB Spalteholz, 1914 DISCO Ertürk et al., 2012 Belle et al., 2014 Renier et al., 2014 Pan et al., 2016
Simple immersion		
		SeeDB Ke et al., 2013 Ke and Imai, 2014 2,2' -Thiodiethanol (Staudt et al., 2007)
Hyperhydration		
		CUBIC Susaki et al., 2014 Susaki et al., 2015 Scale Hama et al., 2011
Hydrogel embedding		
		CLARITY Chung et Deisseroth, 2013 PACT/PARS Yang et al., 2014 Trewick et al., 2015 SWITCH Murray et al., 2015

Figure 30. Méthodologie des techniques de transparisation de tissus.

Les techniques de transparisation peuvent être classées en deux grandes catégories : les techniques à base de solvants organiques et celles à base d'agents hydrophiles. Les premières regroupent le BABB et les techniques de type DISCO consistant à déshydrater les échantillons dans des bains de plus en plus concentrés, puis à les délipider et pour finir à les décolorer. Les secondes peuvent être divisées en plusieurs catégories : i) à inclusion en hydrogel avec CLARITY, PACT/PARS et SWITCH où les échantillons sont inclus dans de l'hydrogel et les lipides retirés avec du détergeant ou par électrophorèse ; ii) en immersion simple en adaptant l'indice de réfraction à celui de l'échantillon grâce à un milieu spécifique comme le glycérol, le 2,2'-Thiodiethanol ou le fructose avec SeeDB; et iii) par hyper-hydratation en enlevant les lipides avec des détergents puis du sucrose ou de l'urée avec CUBIC et Scale. (d'après Richardson and Lichtman, 2015)

stabilité des protéines fluorescentes, et résolution nécessaire.

Objectifs du projet

Mes travaux de thèse ont pour objectif de mieux comprendre le développement du réseau astroglial dans le cortex cérébral de souris. Il s'inscrit dans un contexte international où les astrocytes ne sont plus considérés comme des simples cellules de support et où l'importance de comprendre leurs rôles, leur fonctionnement et leur développement, prend de l'ampleur. En effet, si l'hétérogénéité des astrocytes à l'échelle morphologique, moléculaire, fonctionnelle et régionale a été largement décrite, l'origine de cette hétérogénéité et la manière dont le réseau d'astrocytes se construit à partir des progéniteurs corticaux suscite encore beaucoup d'interrogations. Quelle est la contribution individuelle des progéniteurs corticaux à la construction et à la maturation du réseau astroglial ? L'hétérogénéité des astrocytes provient-elle de progéniteurs hétérogènes eux-mêmes ? J'aborderai ces questions en profitant des technologies développées dans l'équipe et avec nos collaborateurs : la stratégie de marquage multicolore MAGIC Markers et les techniques innovantes d'imagerie associées.

Dans un premier temps, je poserai les bases méthodologiques de ce travail de thèse qui repose sur l'optimisation du marquage stable des progéniteurs corticaux et leur descendance astrocytaire avec les MAGIC Markers afin d'étudier la composition et le positionnement des clones d'astrocytes et répondre aux questions suivantes : combien de cellules sont générées par ces progéniteurs et avec quelle variabilité ? Les cellules sœurs partagent-elles une identité unique et que pouvons-nous en déduire de la potentialité de leurs progéniteurs ? Où sont positionnées les cellules sœurs, comment se dispersent-elles et s'agencent-elles pour former un réseau continu et est-ce corrélé à leur dynamique de prolifération ? Comment évoluent et se stabilisent ces clones au cours du développement à l'échelle clonale et cellulaire en termes d'organisation et de morphologie et ces processus sont-ils dynamiques ?

Une des questions qui restent en suspens concernant le développement des astrocytes dans le cortex cérébral concerne l'hétérogénéité de leur origine développementale, ou en d'autres termes, la description précise des différentes sources de progéniteurs d'astrocytes, qui pourraient être à l'origine de l'hétérogénéité astrocytaire observée dans le réseau mature. En effet la double contribution pré et post-natale des progéniteurs des zones ventriculaire et sous ventriculaire est encore

aujourd'hui controversée. Une difficulté majeure à la résolution de ces problématiques est l'absence de marqueurs précoces, spécifiques et fiables des astrocytes. Dans la seconde partie de ces travaux, je m'attacherai par conséquent à caractériser les multiples sources de production des astrocytes corticaux avec notamment une attention particulière portée au facteur de transcription Olig2 qui apparaîtrait comme un candidat sérieux de marqueur précoce. D'autre part, je m'intéresserai à la contribution postnatale des progéniteurs corticaux à la formation du réseau astroglial afin de déterminer si cette contribution existe effectivement et dans quelles proportions, quand elle s'achève et comment les cellules nouvellement générées s'intègrent dans le parenchyme cortical.

Le réseau astrocytaire cortical se construit progressivement grâce à des phases de prolifération, de migration et de maturation morphologique. Cependant, contrairement aux neurones qui ont été largement étudiés, les mécanismes qui régulent ces différents processus chez les astrocytes sont encore très mal connus. La troisième partie, composée de résultats préliminaires, s'attachera donc à explorer les mécanismes de régulation de la mise en place du réseau astrocytaire cortical, avec l'étude du rôle potentiel de la signalisation candidate Eph/éphrine dans ces processus et, le cas échéant, du mode d'action de cette voie de signalisation (autonome cellulaire et/ou non autonome cellulaire).

Résultats

PARTIE 1 : Etude de la formation du réseau astrocytaire cortical par une stratégie d'analyse multiclonale

L'objectif de cette première partie est de comprendre comment le réseau astroglial cortical se met en place chez le modèle murin à partir des progéniteurs de la zone ventriculaire dorsale pris individuellement. Pour répondre à cette problématique, une technique d'analyse clonale multicolore a été utilisée pour analyser d'une part la descendance astrocytaire de progéniteurs distincts en termes de composition, positionnement et dispersion dans le parenchyme cortical, et d'autre part la dynamique proliférative et la maturation morphologique des cellules sœurs au cours du développement du cortex cérébral.

1. Marquage combinatoire clonal des astrocytes dans le cortex cérébral murin

Les astrocytes corticaux sont générés pendant une période étendue allant de la fin de l'embryogenèse à plusieurs semaines après la naissance. Comment cibler les progéniteurs dont ils sont issus de manière individuelle avec des marqueurs stables dans le temps et au cours des divisions cellulaires, de manière à différencier leurs contributions respectives au réseau astrocytaire? Dérivés de la stratégie Brainbow (Livet et al., 2007), les MAGIC Markers (Loulier et al., 2014) et leurs systèmes de transposition offrent la possibilité d'étudier le réseau astrocytaire au cours du développement cortical.

1.1. La stratégie de marquage multicolore MAGIC Markers

L'analyse de cerveaux murins électroporés au jour embryonnaire 13 (E13) avec le transgène $T2Cytbow$ a précédemment mis en évidence la possibilité de marquer des astrocytes à des stades postnataux dans le cortex cérébral (Loulier et al., 2014). Ce marquage multicolore permet de suivre des progéniteurs corticaux voisins et leur descendance respective au cours du développement grâce à un code couleur. Afin d'étudier la descendance astrocytaire de ces progéniteurs de manière fiable, les MAGIC Markers nucléaire $T2Nucbow$ et cytoplasmique $T2Cytbow$ ont été utilisés conjointement (Figure 31a), augmentant ainsi le nombre de combinaisons de couleurs utilisables pour distinguer des clones voisins. La gamme de couleurs ainsi obtenue dépend du nombre de copies de chaque transgène présentes dans une

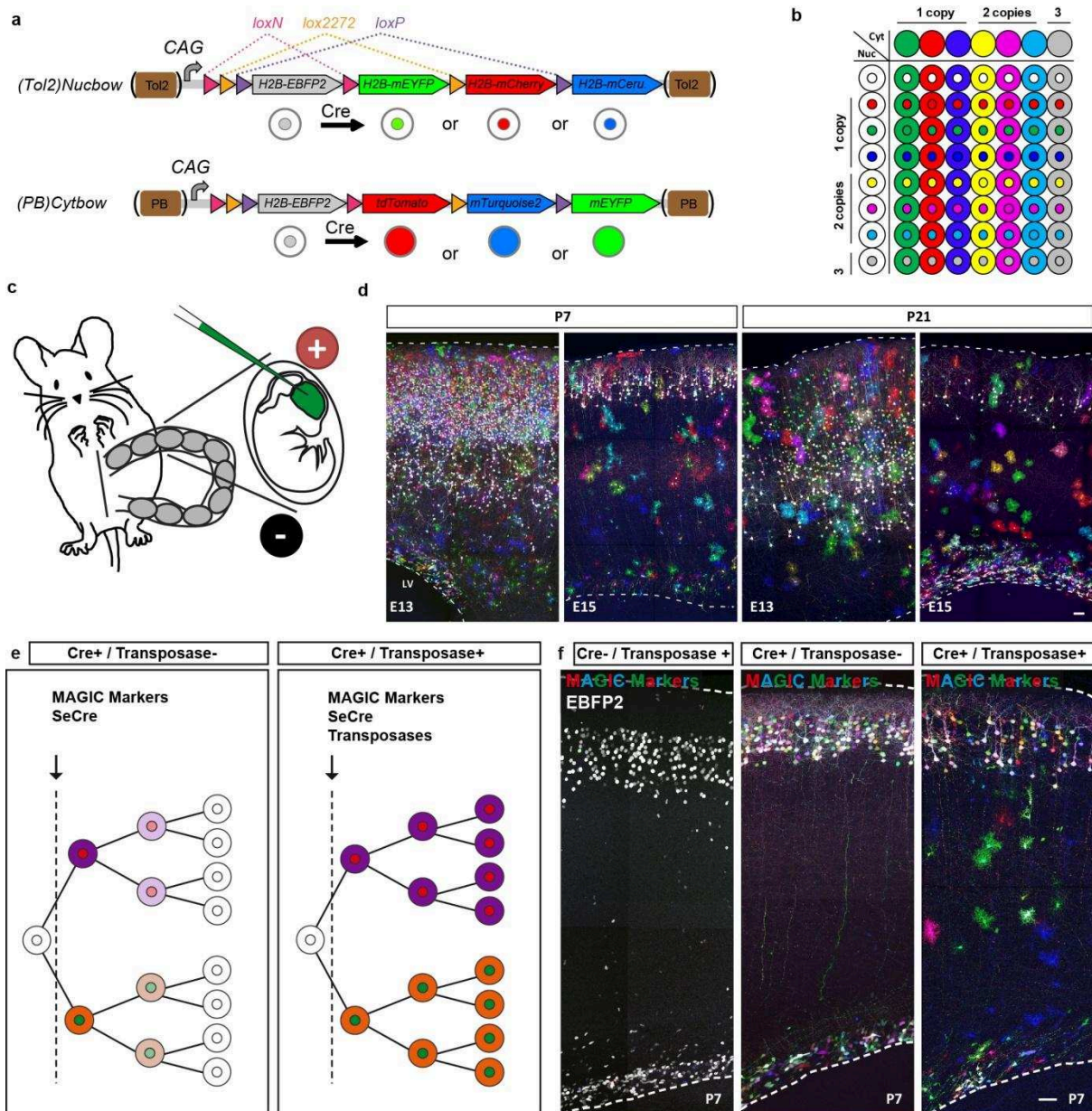


Figure 31. Astrocyte multicolor labeling following mouse *in utero* electroporation of MAGIC Markers in cortical progenitors.

(a) MAGIC Markers constructs for integrative combinatorial labeling. (b) Theoretical color combinations obtained with one to three transgene copies in two subcellular compartments. (c) *In utero* electroporation procedure. (d) E13 and E15 mouse *in utero* electroporation of MAGIC Markers labels neurons in cortical layers 2-3 and astrocytes in the whole parenchyma at both P7 and P21. (e) Episomal compared to integrative strategy to track long term descent of cortical progenitors. (f) Control electroporations showing no recombination without co-electroporation with Cre plasmids, and no astrocyte labeling without transposases.

Maximal projections of 80 μ m-thick sagittal sections. Dotted line: pial surface and ventricular zone. Scale bars: 50 μ m.

cellule (Figure 31b). Dans des conditions conduisant à l'intégration de 1 à 3 copies (ou plus), on obtient 56 combinaisons de couleurs possibles contre 7 couleurs possibles avec le transgène ^{T2}*Cytbow* seul sur la base de la présence ou l'absence de chaque protéine fluorescente dans chaque compartiment subcellulaire. De plus, l'expression d'au moins un exemplaire du transgène dans le cytoplasme permet de déterminer la morphologie de la cellule et de donner ainsi des indications sur son identité, rendant possible l'étude du lignage astrocytaire.

1.2. Stabilité du marquage multicolore au cours du temps

Les MAGIC Markers ont été électroporés avec leurs transposases respectives (Tol2-ase et PiggyBac-ase) et la forme auto excisable de la Cre recombinase (self excisable Cre ou SeCre) à différents stades prénataux, E13 et E15, afin d'observer les populations astrocytaires issues des progéniteurs corticaux à des stades plus tardifs : aux jours postnataux 4, 7 et 21 (P4, P7 et P21). La SeCre est utilisée pour favoriser autant que possible une recombinaison transitoire et éviter des recombinaisons successives susceptibles de modifier la couleur d'une partie d'un clone. La méthode d'électroporation *in utero* consiste à injecter des solutions d'ADN dans les ventricules latéraux des embryons puis d'appliquer un courant électrique permettant à l'ADN de pénétrer dans les progéniteurs bordant le ventricule grâce à la formation transitoire de pores suffisamment grands pour laisser passer des macromolécules comme l'ADN (Figure 31c). Les animaux poursuivent ensuite leur développement normal jusqu'au stade de prélèvement et d'analyse souhaité. L'électroporation des MAGIC Markers permet de marquer efficacement les cellules générées au temps de l'électroporation (progéniteurs et neurones) puis toutes les cellules générées par la suite, à savoir neurones et cellules gliales, grâce à deux aspects ; premièrement, les transgènes sont sous contrôle du promoteur à spectre large CAG exprimé dans la majorité des cellules neurales (Jun-ichi et al., 1989; Hitoshi et al., 1991; Okabe et al., 1997) (Figure 31d) ; deuxièmement l'utilisation des systèmes de transposition Tol2 et PiggyBac (Lacoste et al., 2009; Sato et al., 2007; Yoshida et al., 2010) permet l'intégration des MAGIC Markers dans le génome des cellules ciblées grâce aux séquences de transposition encadrant les transgènes. Cela se traduit par une expression à long terme des marqueurs, alors que sans système de transposition les plasmides sont dilués au fur et à mesure des divisions cellulaires (Figure 31e). Le marquage provenant d'épisomes non intégrés (ou

s'intégrant à un stade ultérieur à l'électroporation) demeure cependant présent dans la mesure où tous les exemplaires des plasmides électroporés ne sont pas intégrés dans le génome des progéniteurs ciblés, mais il est restreint aux cellules nées au temps de l'électroporation, ici des neurones pyramidaux migrant vers les couches superficielles du cortex (Saito and Nakatsuji, 2001) (Figure 31f). Ceci explique pourquoi ces neurones présentent un marquage intense, avec des couleurs pastel (peu saturées), résultant de l'expression de nombreux exemplaires des transgènes. En revanche, les épisomes sont dilués avant la génération des astrocytes, garantissant une analyse clonale fiable de ces derniers.

1.3. Elaboration d'une stratégie de marquage spécifique des astrocytes

La stratégie MAGIC Markers permet d'étudier le développement du réseau astroglial dans le cortex cérébral murin de la cellule souche au réseau mature, elle permet donc de s'intéresser à la nature et à l'organisation des cellules générées, sans toutefois être spécifique des astrocytes. Afin de s'affranchir du marquage neuronal qui peut gêner l'analyse clonale des astrocytes corticaux, mais aussi du marquage des cellules gliales non astrocytaires dont les morphologies immatures pourraient être confondues avec celles des astrocytes et dont l'identification formelle nécessite l'utilisation de marqueurs immunohistochimiques spécifiques, une modification des MAGIC Markers initiaux a été réalisée. Le promoteur ubiquitaire CAG a été remplacé par le promoteur spécifique astrocytaire Gfa-ABC(1)D qui est la forme courte du promoteur GFAP (Lee et al., 2008) (Figure 32a), à partir d'un plasmide donné par Gilles Bonvento (Cea, Fontenay-aux-Roses). Cependant, si l'électroporation *in utero*, à E13 des nouveaux transgènes présente bien un marquage spécifique des astrocytes dans le cortex cérébral murin au terme de la première semaine postnatale (Figure 32b), le nombre de combinaisons de couleurs générées semble limité. En effet, même en augmentant les concentrations des plasmides (de 0,8 µg/µl à 1,56 µg/µl pour chacun des marqueurs, pour une concentration finale maximale de 5 µg/µl de solution injectée), les astrocytes générés sont marqués principalement en rouge, vert ou bleu, avec seulement quelques cellules présentant des couleurs complexes, et presque aucune avec une combinaison noyau-cytoplasme.

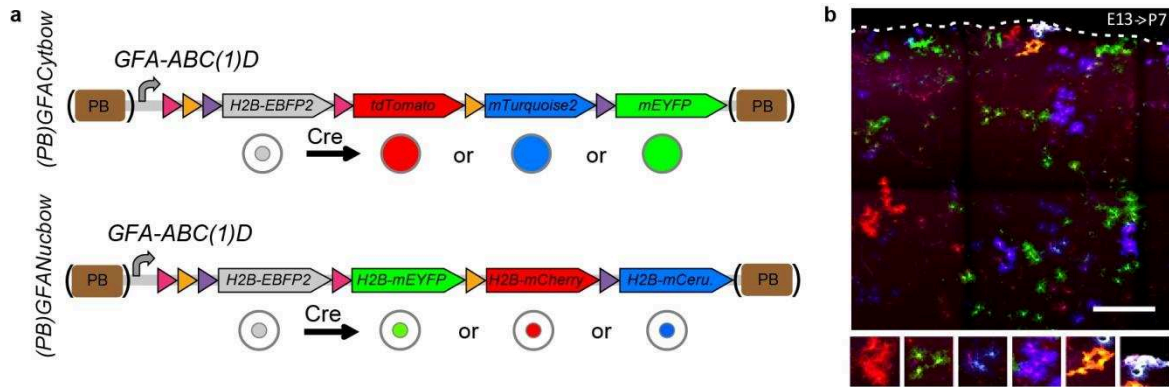


Figure 32. Astrocyte-specific labeling strategy using mouse *in utero* electroporation of modified MAGIC Markers.

(a) MAGIC Markers for integrative combinatorial labeling of astrocytes with the GFA-ABC(1)D promoter instead of the CAG promoter. (b) *In utero* electroporation of (PB)GfaCytbow and (PB)GfaNucbow results in astrocyte-specific labeling of cortical cells, with a limited number of colors.

Maximal projection of 80 μm -thick sagittal section. Dotted line: pial surface. Scale bar: 200 μm .

Cette limite technique rend l'analyse clonale difficile car réduisant drastiquement le nombre de clones exploitables par animal. A cela s'ajoute la crainte d'obtenir des clones incomplets, suite à la régulation différentielle du promoteur GFAP dans les sous-types d'astrocytes observés (Bignami and Dahl, 1974; Pixley and de Vellis, 1984; Campbell and Götz, 2002; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). L'analyse clonale a donc finalement été réalisée avec la stratégie ubiquitaire reposant sur l'expression du promoteur ubiquitaire CAG et une identification des cellules basée sur leur morphologie.

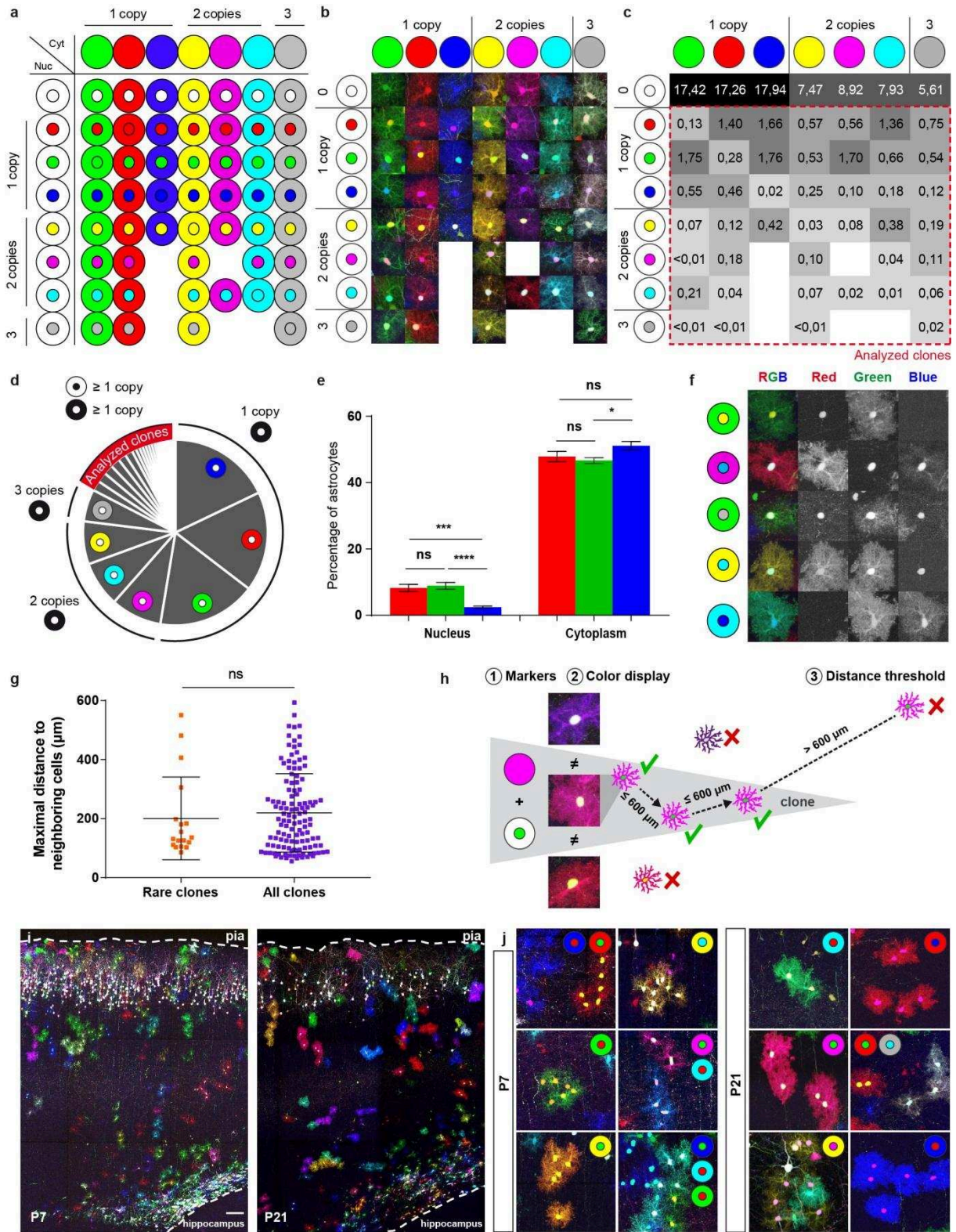
1.4. Analyse clonale des astrocytes corticaux

Avec la co-expression des constructions nucléaire et cytoplasmique MAGIC Markers, 56 combinaisons de couleurs comprenant au moins un exemplaire de T^2 Cytbody sont possibles. Sur douze animaux électroporés à E13 ou E15, et analysés à P7 ou P21, représentant 57535 astrocytes pointés manuellement à l'aide du logiciel TrakEM2 pour Fiji (Cardona et al., 2012) sur des projections maximales de coupes sagittales de 80 μ m d'épaisseur imagées en microscopie confocale, 50 combinaisons de couleurs différentes ont été observées (Figure 33a-b) et inventoriées, permettant de calculer leur fréquence (Figure 33c-d). Les résultats montrent qu'une grande majorité des cellules exprime uniquement un marqueur

Figure 33. Clonal astrocyte analysis following mouse *in utero* electroporation of MAGIC Markers in cortical progenitors.

(a-b) Inventory of the color combinations displayed by 57535 astrocytes (n=12 animals) enables to estimate their frequency (in %) (c). (d) Restriction of the clonal analysis to astrocytes expressing nucleus-cytoplasm combinations found in less than 2% of labeled astrocytes. (e) Percentage of astrocytes expressing the three different markers in the nucleus and the cytoplasm. Blue nuclei are more rarely found than red or green nuclei and blue cytoplasms are more frequent than red or green cytoplasms. (f) Example of unique combinations found in one animal and used to determine a maximal distance between sister cells for clonal analysis. (g) Estimation of maximal distance between neighboring sister cells of rare clones (displaying unique nucleus/cytoplasm color combinations) provides a 600 μ m distance threshold to assess the maximal dispersion among clonally-related astrocytes. (h) Cells belonging to a clone are defined by the presence or absence of the three markers in their two subcellular compartments, their final color display (intensity) and a maximum distance of 600 μ m from one sister cell to another. (i-j) E15 *in utero* electroporation of MAGIC Markers in mouse embryos results in the combinatorial labeling of astrocyte clones at P7 and P21.

Maximal projections of 80 μ m-thick sagittal sections. Dotted lines: pial surface and ventricular zone. Means \pm s.e.m. Scale bar: 100 μ m.



(légende sur la page précédente)

cytoplasmique, rouge, vert ou bleu, un quart contient deux marqueurs, avec des cellules de couleur jaune, cyan ou magenta, 5% les trois marqueurs, et 17% présentent des combinaisons de couleurs noyau-cytoplasme, chacune d'entre elles représentant moins de 2% des cellules marquées. La répartition dans l'espace colorimétrique RVB n'est pas tout à fait équilibrée dans les échantillons analysés (Figure 33e). En effet les noyaux bleus sont rares ou plus difficiles à détecter vraisemblablement car les transgènes ^{PB}*Cytbow* et ^{T2}*Nucbow* codent des protéines fluorescentes cyan, mCerulean et mTurquoise2, de brillance et photostabilité inégales. La seconde de ces protéines étant détectée plus efficacement, les cytoplasmes bleus peuvent de ce fait être observés plus fréquemment. Ce sont les combinaisons rares, c'est-à-dire comprenant au moins deux marqueurs incluant au moins un marqueur dans chaque compartiment subcellulaire qui ont été utilisées pour réaliser les analyses clonales.

En plus de la combinatoire complexe noyau-cytoplasme, deux critères supplémentaires ont été établis pour caractériser un clone (un progéniteur et toute sa descendance) car même si le risque est limité, deux cellules pourraient présenter la même combinatoire de couleur complexe et ne pas être issues pour autant d'un même progéniteur : i) la couleur finale ou apparente du cytoplasme et du noyau des cellules, qui est fonction de l'intensité de chacun des marqueurs exprimés dans le noyau et le cytoplasme (Figure 33h) et ii) la distance maximale entre cellules sœurs voisines : une analyse des combinaisons de couleurs les plus rares, retrouvés une unique fois au sein de chaque animal et identifiant a priori des clones individuels (Figure 33f) a permis de mesurer la distance maximale entre cellules sœurs (600 µm) (Figure 33g). Cette distance a été par la suite utilisée pour séparer les clones présentant une combinaison de couleurs noyau-cytoplasme identique. Un clone est donc défini par des cellules présentant i) une combinaison identique de marqueurs noyau-cytoplasme (absence ou présence de chaque protéine fluorescente dans les deux compartiments), ii) la même couleur finale ou apparente (ex noyau jaune et cytoplasme violet), et iii) séparées par une distance maximale de 600 µm. Selon ces critères, l'électroporation *in utero* des MAGIC Markers dans des embryons de souris à E15 permet d'identifier de nombreux clones astrocytaires par animal (de 40 à 180) (Figure 33i) et de les analyser individuellement (Figure 33j). Pour cela, toutes les cellules marquées ont été manuellement pointées sur des projections maximales de

coupes s riees sagittales de 80  m d'épaisseur acquises de manière mosa ique en microscopie confocale et reconstituées sur Fiji (Preibisch et al., 2009) sur 1 à 2 mm au total afin d'étudier la composition des clones en termes de nombre et sous-types d'astrocytes générés, leur localisation dans le parenchyme cortical ainsi que leur dispersion au cours du développement du cortex cérébral murin.

2. Composition des clones astrocytaires corticaux

Les progéniteurs corticaux sont-ils homogènes ? Génèrent-ils tous le même nombre d'astrocytes et quel est ce nombre ? Chaque progéniteur a-t-il la capacité de produire différents sous-types d'astrocytes et dans quelles proportions ? Pour répondre à ces questions, la taille et les sous-types astrocytaires des clones obtenus avec les MAGIC Markers ont été analysés à différents stades du développement.

2.1. Nombre d'astrocytes générés par des cellules souches neurales voisines

Les analyses clonales effectuées à différents stades du développement cortical (Figure 34a) après électroporation des MAGIC Markers   E15 montrent que les progéniteurs corticaux forment des clones composés en moyenne de quatre astrocytes protoplasmiques à P4, chiffre qui double de P4   P7 et reste ensuite stable jusqu'à la troisième semaine postnatale (Figure 34b), confirmant les études antérieures qui montrent que la première semaine postnatale correspond à une phase proliférative majeure et finale des astrocytes corticaux (Ge et al., 2012). En revanche, l'examen de la distribution de la taille des clones d'astrocytes protoplasmiques révèle une grande variabilité (Figure 34c), avec des clones pouvant aller d'une à quarante-deux cellules. Conformément aux résultats précédents, il y a une plus grande proportion de clones de petite taille à P4, et de clones de grande taille à P7 et P21.

Afin de déterminer si les clones astrocytaires issus de progéniteurs corticaux ciblés par électroporation *in utero*   différents stades de la corticog nese sont identiques, des électroporations *in utero*   E13 (début de neurog nese) et   E15 (fin de neurog nese) ont été réalisées et la taille des clones astrocytaires a été analys e à P7 et P21. Contrairement à une électroporation *in utero* des MAGIC Markers ciblant les progéniteurs corticaux à E13 qui présente un marquage neuronal sur

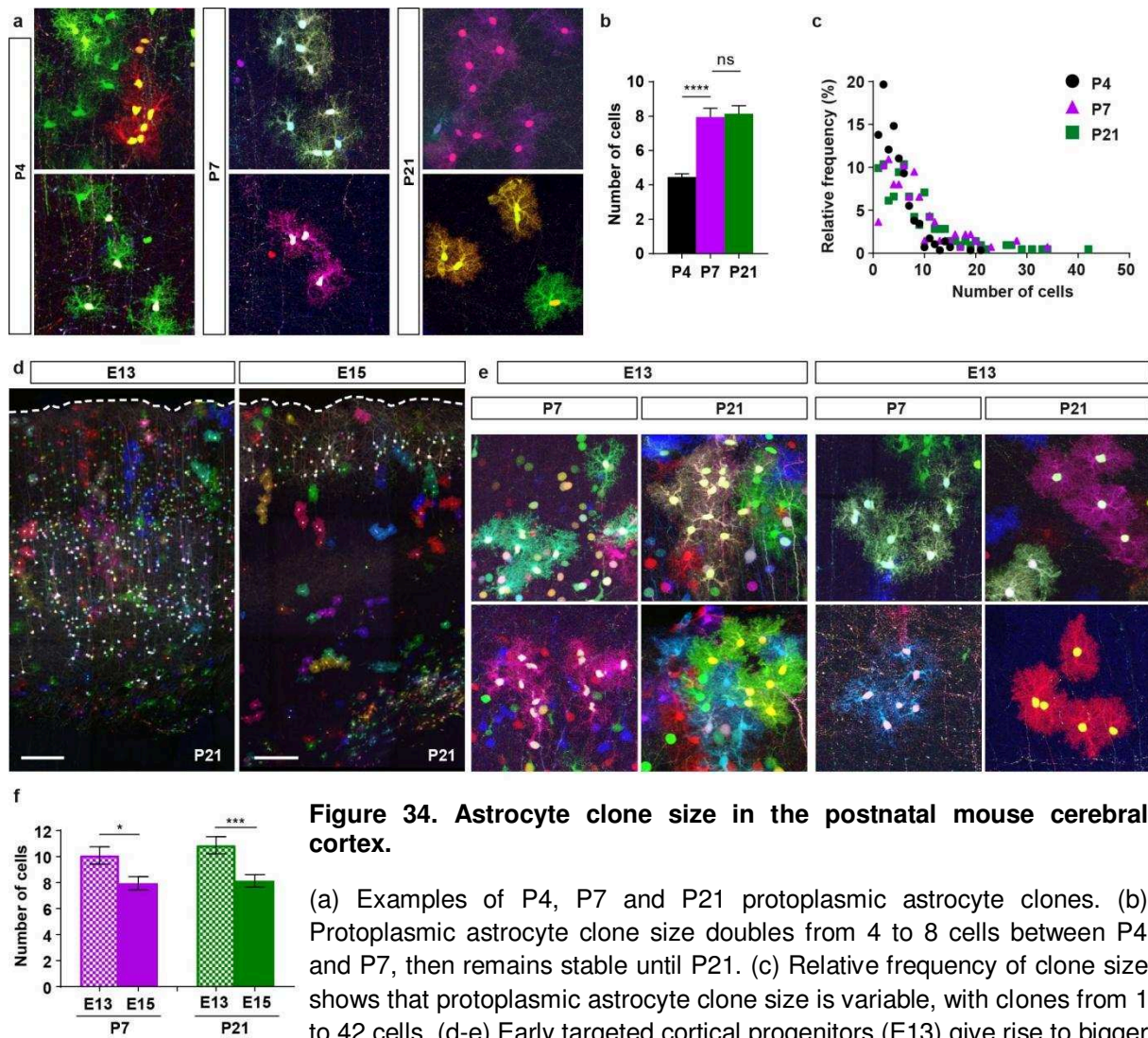


Figure 34. Astrocyte clone size in the postnatal mouse cerebral cortex.

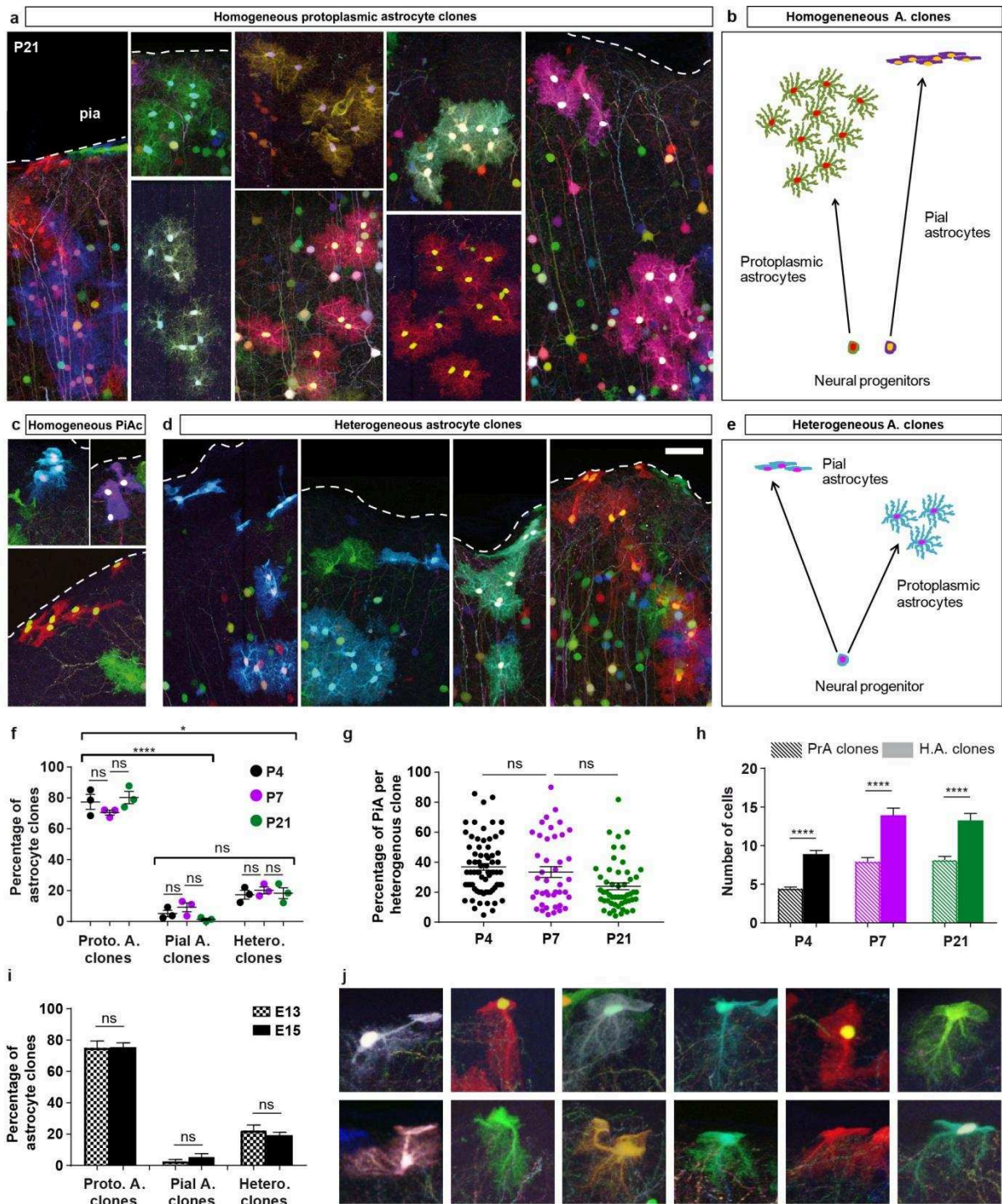
(a) Examples of P4, P7 and P21 protoplasmic astrocyte clones. (b) Protoplasmic astrocyte clone size doubles from 4 to 8 cells between P4 and P7, then remains stable until P21. (c) Relative frequency of clone size shows that protoplasmic astrocyte clone size is variable, with clones from 1 to 42 cells. (d-e) Early targeted cortical progenitors (E13) give rise to bigger clones compared to those targeted at E15.

Maximal projections of 80-µm thick sagittal sections. Dotted lines: pial surface. Means ± s.e.m. Scale bars: 200 µm.

presque toute l'épaisseur du cortex, une électroporation *in utero* à E15 marque uniquement les neurones pyramidaux des couches corticales II/III (Figure 34d). Les analyses montrent que les progéniteurs ciblés à E13 génèrent des clones d'astrocytes protoplasmiques de plus grande taille que ceux ciblés à E15 (Figure 34e-f), ce qui est compatible avec l'hypothèse de divisions cellulaires supplémentaires de certains progéniteurs corticaux entre E13 et E15. Cependant la distribution de la taille des clones obtenue par marquage à ces deux stades est similaire et montre une grande variabilité. A quels sous-types astrocytaires appartiennent ces clones de tailles variables observés ?

2.2. Sous-types d'astrocytes générés

Plusieurs sous-types d'astrocytes sont observables dans le parenchyme cortical grâce aux MAGIC Markers : les astrocytes protoplasmiques et les astrocytes de la surface piale. Ces deux sous-types d'astrocytes sont-ils issus d'un progéniteur commun ? Et si oui, dans quelles proportions ? Les analyses clonales réalisées à P4, P7 et P21 après électroporation *in utero* des progéniteurs corticaux à E15 montrent la présence de clones homogènes, contenant un seul de ces sous-types d'astrocyte (Figure 35a-b-c) mais aussi de clones hétérogènes, contenant les deux sous-types (Figure 35d-e). Ces différents types de clones sont représentés dans des proportions stables de P4 à P21, avec une majorité (76%) de clones homogènes de type protoplasmique, 5% de clones homogènes de type pial et 19% de clones hétérogènes (Figure 35f). Si plus de 80% des astrocytes de type pial appartiennent à des clones de type hétérogène, ces clones hétérogènes ont des proportions d'astrocytes protoplasmiques/piaux très variables, avec une moyenne de 30% d'astrocytes de type pial (Figure 35g). Ceci démontre l'existence de progéniteurs corticaux bipotents, capables de générer les deux sous-types d'astrocytes. Les clones hétérogènes issus de ces progéniteurs présentent une autre particularité : ils sont de plus grande taille que les clones homogènes de type protoplasmique (Figure 35h). Au moins une partie des progéniteurs corticaux peut donc générer plusieurs sous-types d'astrocytes, contrairement aux résultats présentés par une étude antérieure (García-Marqués and López-Mascaraque, 2013). Cependant, à ce stade de l'étude, rien ne permet d'affirmer que tous ont strictement les mêmes potentialités, même si leur capacité à générer différents sous-types d'astrocytes n'est pas modifiée entre différents stades d'électroporation étudiés (E13 et E15, Figure 35i). De plus, de



(légende sur la page suivante)

Figure 35. Astrocyte subtypes generated by neighbouring cortical neural progenitors.

Homogeneous clones of protoplasmic astrocytes or pial astrocytes (a-b-c) and heterogeneous clones, containing both astrocyte types (d-e), were found in stable proportions (respectively 76, 5 and 19% of clones) during postnatal development (f). (g) The number of pial astrocytes within heterogeneous clones is very variable, with a 30% average. (h) Heterogeneous astrocyte clones are larger than homogeneous protoplasmic astrocyte clones. (i) Cortical progenitors targeted at E13 or E15 give rise to the same proportions of homogeneous/heterogeneous astrocytes clones. (j) Intermediate morphologies between pial astrocytes and protoplasmic astrocytes observed at P21: several iterations of astrocytes exhibit intermediate phenotype including both fibroblast-like feature at one extremity and bushy ramifications at the other extremity.

Maximal projections of 80 μm -thick sagittal sections. Dotted lines: pial surface. Means \pm s.e.m. Scale bar: 50 μm .

manière très intéressante, nous avons découvert des morphologies intermédiaires entre astrocytes de type protoplasmique et astrocytes de type pial (Figure 35j). Ces cellules ont un phénotype de type fibroblaste d'un côté, et un phénotype ramifié de l'autre. Dès lors, l'appartenance des cellules générées à un sous-type astrocytaire particulier serait-elle liée uniquement à leur localisation dans le cortex cérébral : au niveau de la surface piale ou dans le parenchyme ? Pour répondre à cette question, nous avons analysé le positionnement des cellules de chaque clone.

3. Positionnement des clones astrocytaires dans le cortex cérébral

Afin d'obtenir le positionnement des cellules de manière automatique à partir de leurs coordonnées XY une collaboration a été réalisée avec Sio-Hoi Ieng (Institut de la Vision, Paris). La position relative des cellules dans l'épaisseur corticale a été déterminée en calculant le ratio entre la distance cellule-surface piale et la distance surface ventriculaire-surface piale sur le même axe, la valeur 100% correspondant à la surface piale. Les distances ont été mesurées automatiquement sur Matlab grâce aux coordonnées des cellules (précédemment déterminées) et au dessin manuel des extrémités corticales sur chaque coupe, servant de masque pour l'analyse. Ainsi les mesures s'affranchissent des différences d'épaisseur du cortex cérébral quel que soit le stade d'analyse. A partir de ces ratios, le barycentre de chaque clone a pu être calculé pour étudier son positionnement dans le parenchyme cortical (Figure 36a).

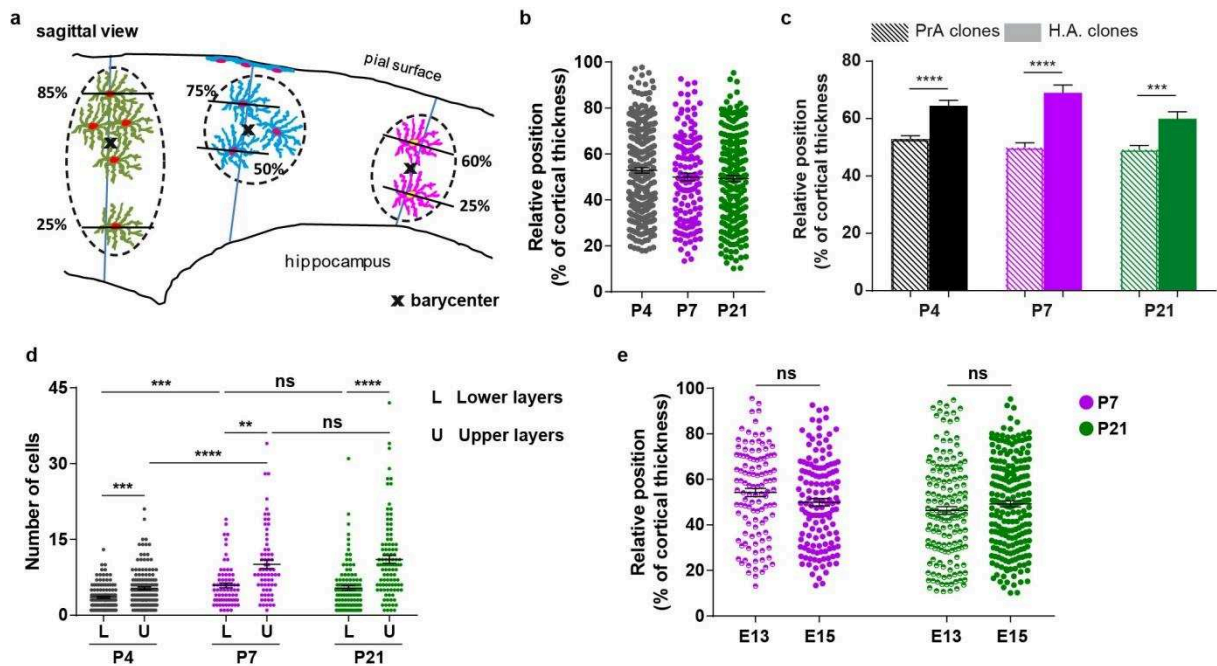


Figure 36. Localization of cortical progenitors' astrocyte descent.

(a) Schematic representation of the method used to calculate astrocyte clone barycenters. 100% corresponds to the pial surface. For heterogeneous clones, pial astrocytes were excluded. (b) Protoplasmic astrocyte clone barycenters show that clones are found in the entire parenchyma with no preference of localization at all observed stages. (c) Excluding cells belonging to the pial astrocyte subtype, clones barycenter analysis reveals that heterogeneous clones are located higher than homogeneous protoplasmic clones in the cortical parenchyma. (d) Protoplasmic astrocyte clones from upper layers are bigger than those found in lower layers. (e) Astrocyte clone location does not differ according to the developmental stage (E13 or E15) of cortical progenitors electroporation.

Means \pm s.e.m.

Les barycentres des clones se répartissent de manière uniforme sur toute l'épaisseur du cortex à tous les stades observés (à l'exception des couches les plus externes et internes), avec une position moyenne située au milieu du cortex qui reste stable au cours du développement (Figure 36b), indiquant que les progéniteurs ciblés par la stratégie MAGIC Markers ne présentent pas de biais quant à la localisation des clones qu'ils génèrent. En revanche, les clones hétérogènes sont situés plus haut dans le parenchyme que les clones homogènes protoplasmiques (Figure 36c). Ce résultat a été obtenu en excluant les astrocytes de la surface piaie du calcul afin de ne pas biaiser la position moyenne des astrocytes protoplasmiques de ces clones hétérogènes. Comme ces clones hétérogènes sont aussi plus gros que les clones homogènes, la taille de ces derniers a été analysée en fonction de leur localisation dans le parenchyme cortical : les résultats montrent que les clones d'astrocytes protoplasmiques des couches corticales supérieures sont composés d'un plus grand nombre de cellules que ceux situés dans les couches inférieures (limite positionnée à 50% de l'épaisseur corticale) (Figure 36d). Que les progéniteurs corticaux aient été ciblés à E13 ou E15 ne semble pas non plus avoir de conséquences sur le positionnement des clones d'astrocytes protoplasmiques puisque ceux-ci ont une position similaire quelque soit le stade d'électroporation (Figure 36e). La taille des clones est donc liée à localisation des cellules générées mais aussi à leur identité, les clones d'astrocytes protoplasmiques de la moitié haute du cortex cérébral ayant une taille inférieure à celle des clones hétérogènes. Au-delà de la localisation moyenne des clones astrocytaires, l'observation individuelle des cellules qui les composent semble indiquer des dispositions particulières dans l'espace, posant la question de leur dispersion et de la dynamique de prolifération qui est à l'origine de leur positionnement.

4. Dispersion et prolifération des astrocytes dans le parenchyme cortical

Les clones d'astrocytes corticaux forment-ils des colonnes à l'instar de ce qui est observé pour le développement des neurones pyramidaux ? Comment les cellules sœurs se dispersent-elles dans le parenchyme cortical, et restent-elles ou non en contact ? Les astrocytes sont majoritairement générés au cours de la première semaine postnatale (Ge et al., 2012). Pendant cette période, quelle est leur

dynamique de prolifération à l'échelle clonale et quel impact cela a-t-il à l'échelle du réseau ? Que se passe-t-il ensuite lors de la poursuite du développement : le réseau est-il stable et figé ? Pour répondre à ces questions, nous avons tout d'abord étudié la première semaine postnatale, avec l'analyse de la dispersion et de la prolifération des astrocytes, puis les deux semaines suivantes avec des analyses de dispersion à l'échelle clonale d'une part, et des analyses morphologiques à l'échelle cellulaire d'autre part.

4.1. La dynamique de prolifération et de dispersion pendant la première semaine postnatale

4.1.1. Dispersion

Les clones d'astrocytes protoplasmiques peuvent se présenter sous des formes variées : en groupes et/ou en colonnes comprenant également, ou non, des cellules isolées (Figure 37a). Dans un premier temps, l'étendue de leur dispersion a été étudiée au cours de la première semaine postnatale (Figure 37b). La dispersion des clones selon l'axe dorsoventral a été déterminée sur coupes sériées sagittales en calculant la différence entre les positions relatives des cellules sœurs situées aux extrémités haute et basse du clone. Les résultats montrent que cette dispersion augmente significativement entre P4 et P7 (Figure 37c), indépendamment d'une augmentation de l'épaisseur du cortex cérébral à ces deux stades. La dispersion médiolatérale a quant à elle été déterminée en comptant le nombre de coupes de 80 μm où était présent chaque clone. Cette dispersion augmente également entre P4 et P7 (Figure 37d). La dispersion est aussi fonction de la taille des clones (Figure 37e-f), mais s'avère très variable, avec des clones pouvant parfois occuper toute l'épaisseur corticale (axe dorsoventral) et se disperser sur plusieurs centaines de micromètres selon l'axe médiolatéral tandis que d'autres présentent un agencement compact. Cependant, cette dispersion augmentant avec la taille des clones, et sachant que celle-ci est plus grande entre les deux stades de développement étudiés, il est difficile de savoir comment la densité cellulaire des clones évolue au cours du développement. Afin de s'affranchir de la composante taille, la dispersion clonale relative a été mesurée en divisant la dispersion totale par le nombre de cellules pour chaque clone. Il s'avère que cette dispersion relative diminue entre P4 et P7 sur les deux axes observés (Figure 37g-h), suggérant une densification du

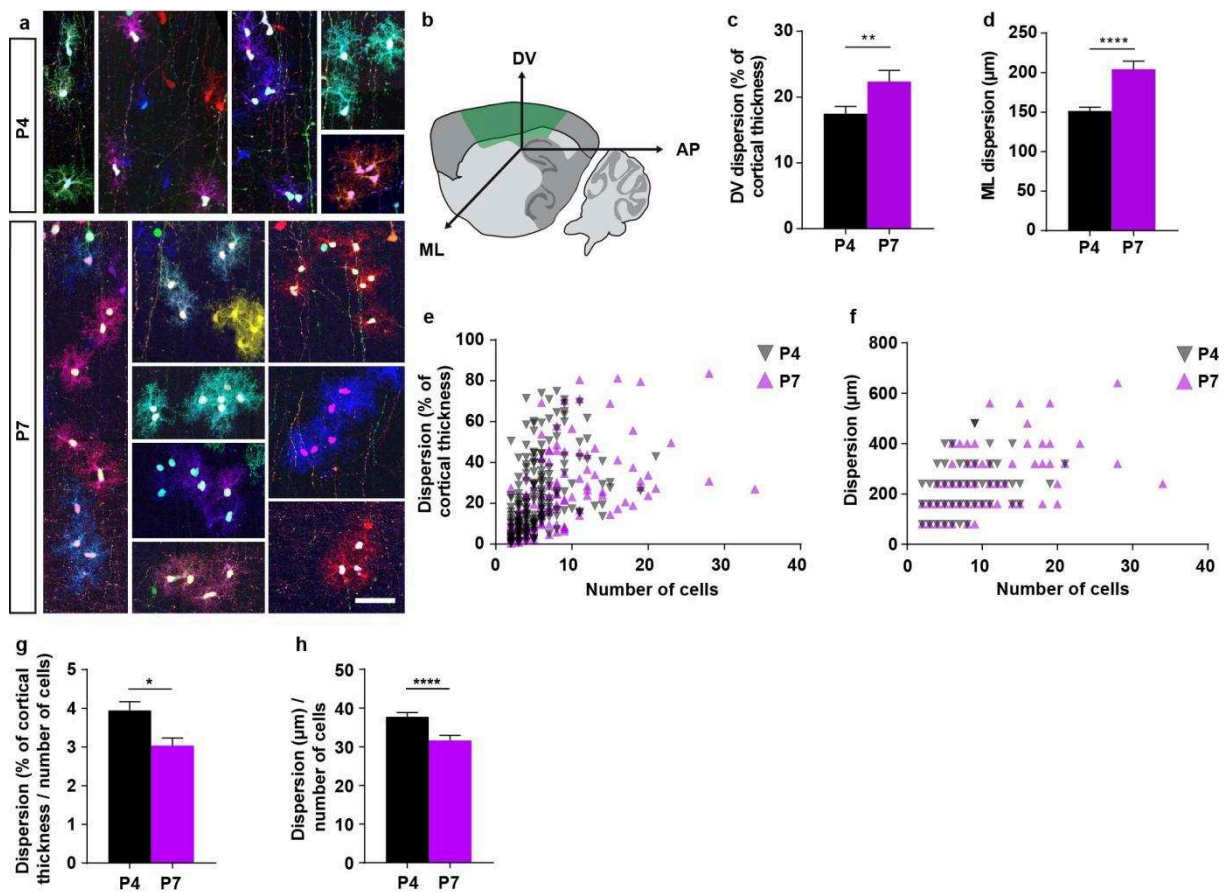


Figure 37. Protoplasmic astrocyte clone dispersion during the first postnatal week.

(a) Protoplasmic astrocyte clones display various spatial arrangements at both P4 and P7. (b) Schematic view of astrocyte clone dispersion along the DV, ML and AP axes. (c-d) DV and ML dispersions decrease from P4 to P7. (e-f) DV and ML dispersions of protoplasmic astrocyte clones comprised of ≥ 2 cells are broad and variable. (g-h) Relative DV and ML dispersions decrease from P4 to P7.

Maximal projections of 80 μm -thick sagittal sections. DV: dorsoventral, ML: mediolateral, AP: anteroposterior. Means \pm s.e.m. Scale bar: 50 μm .

réseau astroglial à l'échelle clonale au cours de la première semaine postnatale dont l'origine peut être la prolifération locale d'astrocytes.

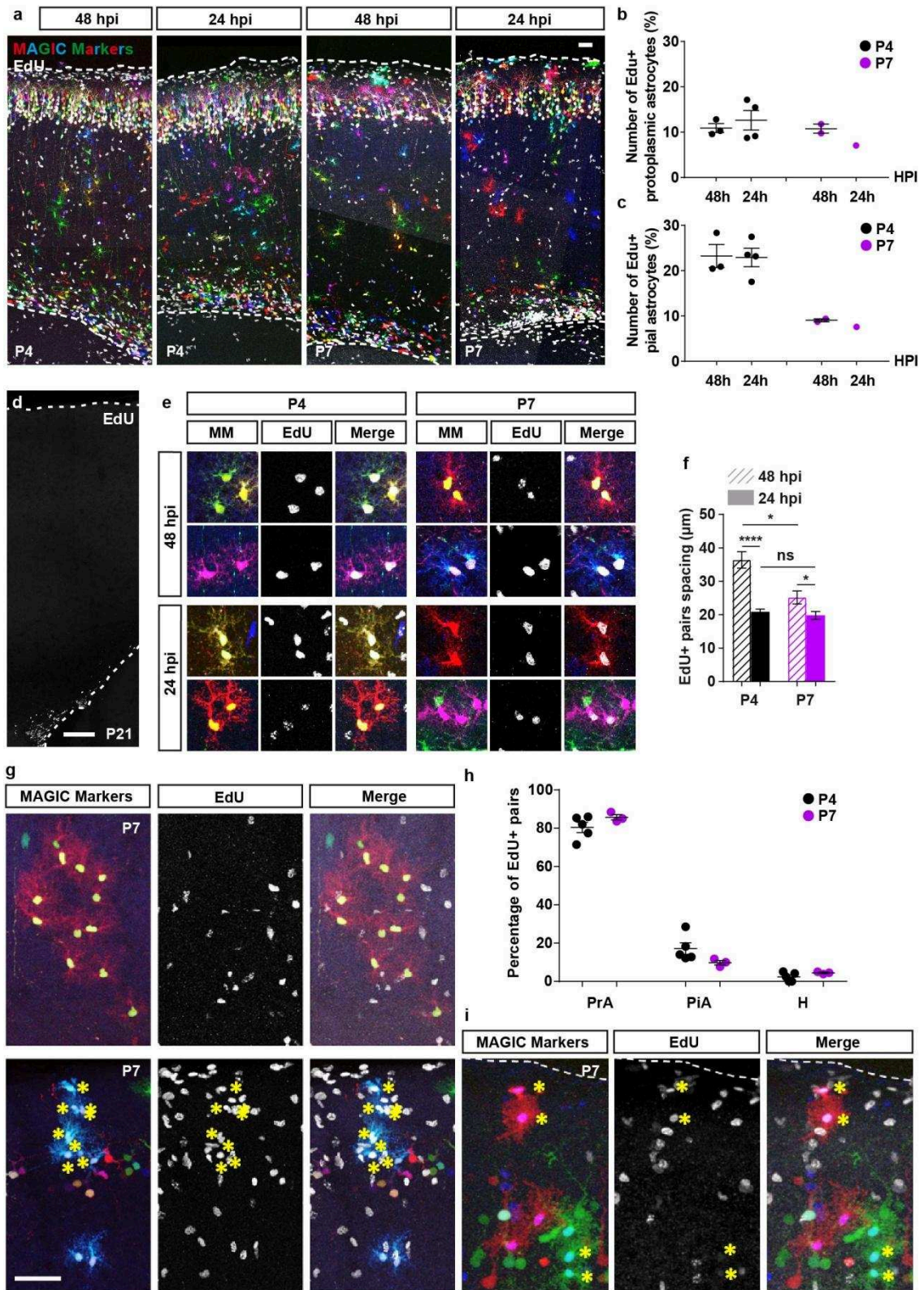
4.1.2.Prolifération

Afin d'analyser plus en détail cette densification, la dynamique de prolifération a été étudiée. Les MAGIC Markers ont été électroporés dans des embryons de souris à E15, puis des injections de 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) ont été réalisées sur les petits 24h ou 48h avant les analyses à P4 et P7. La révélation de l'EdU couplé à un fluorochrome Alexa 647 n'interfère pas avec le marquage multicolore MAGIC Markers (excitations à 408, 440, 515 et 559 nm pour le marquage par défaut EBFP2 et les marqueurs bleu, jaune et rouge respectivement, ce qui laisse la bande spectrale infrarouge libre pour des marquages immunohistochimiques). Dans quelles proportions trouve-t-on les astrocytes en prolifération et où se situent-ils dans le parenchyme cortical ? Le marquage EdU est présent sur toute l'épaisseur corticale (Figure 38a). 10% des astrocytes protoplasmiques exprimant les MAGIC Markers à P4 et P7 sont marqués avec l'EdU, et ce aussi bien 24h que 48h après injection de l'EdU (Figure 38b). Cette situation contraste avec les astrocytes de la surface piaie dont 23% expriment les MAGIC Markers à P4, et seulement 9% à P7 (Figure 38c). Ces résultats révèlent un taux de prolifération stable entre P4 et P7 pour les astrocytes protoplasmiques, diminuant entre P4 et P7 pour les astrocytes de la surface piaie. Aucun marquage EdU n'a été détecté dans le cortex cérébral à P21 malgré des cellules marquées au niveau de la zone ventriculaire et du gyrus denté de l'hippocampe, comme attendu dans ces deux zones actives de prolifération du

Figure 38. Proliferation dynamics during the first postnatal week.

(a) Proliferating cells are found in the entire cortical wall at P4 and P7 48h or 24h post-EdU injections. (b) 10% of MM labeled PrA were also EdU+ at all stages studied. (c) 23% of MM labeled PiA were also EdU+ at P4 but only 9% at P7. (d) No EdU labeling was detected in the cerebral cortex at P21. (e) EdU+ color paired cells were identified and distance between EdU+ paired PrA decreases from 48h to 24h post-injection and decreases as well from P4 to P7 (f). (g) Various numbers of EdU+ cells were observed in clones of similar sizes at identical analysis stages. (h) 82%, 14% and 3% of EdU+ astrocyte pairs were PrA, PrI or Heterogeneous pairs respectively (i).

Maximal projections of 80 μm -thick sagittal sections. HPI: hours post-injection. Means \pm s.e.m. Scale bars: a-g: 50 μm ; d: 150 μm .



(légende page précédente)

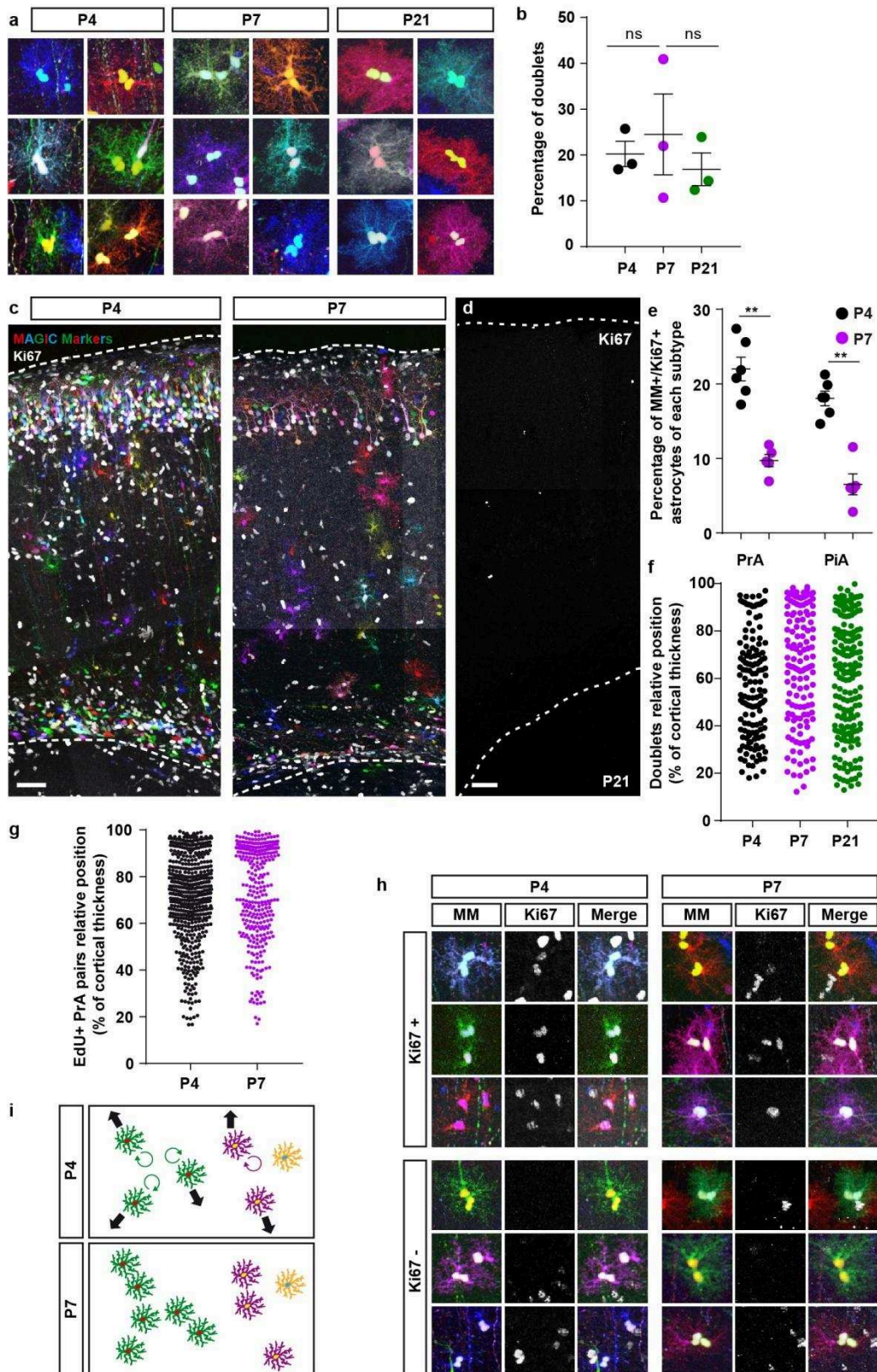
cerveau mature (Altman, 1962, 1963, 1969) (Figure 38d, données non présentées), confirmant l'arrêt de la production d'astrocytes dans le parenchyme cortical à ce stade.

Que deviennent les astrocytes nouvellement générés ? S'éloignent-ils les uns par rapport aux autres et de quelle manière ? Ces processus peuvent-ils être mis en relation avec la densification du réseau astroglial suggérée par les données de dispersion présentées précédemment ? Pour répondre à ces problématiques la distance séparant les paires d'astrocytes protoplasmiques EdU+/MAGIC+ identifiées grâce à leur code couleur a ensuite été mesurée dans le repère XYZ (Figure 38e). Les résultats montrent que les cellules sœurs marquées avec l'EdU 48h avant l'analyse sont plus éloignées les unes des autres que celles marquées à l'EdU 24h avant, à la fois à P4 et P7. En revanche cette distance diminue avec le temps, entre P4 et P7, indiquant un éloignement des cellules sœurs après division qui s'amointrit ou ralentit au cours du développement. Il est intéressant de noter qu'il existe une grande variabilité clonale en termes de dynamique proliférative. Ainsi, au même stade d'analyse, pour des clones de tailles similaires, on peut trouver des cas où presque toutes les cellules sont EdU+ 48h après injection, ou au contraire aucune (Figure 38g). La présence de paires de cellules sœurs EdU+ hétérogènes, comprenant un astrocyte de type protoplasmique et un de type pial (3% des paires observées) confirme une nouvelle fois que ces deux sous-types proviennent de

Figure 39. Doublets are not a reliable indicator of recent division and reveal cell clustering during development.

(a) At P4, P7 and P21, numerous doublets (20% of MM+ protoplasmic astrocytes) can still be found in stable proportions in the cortical parenchyma (b) even though astrocyte proliferation of both astrocyte subtypes, revealed with Ki67 immunostaining, drops drastically from P4 to P21 (c-d-e). (e) At all three stages, doublets are located in the entire cortical parenchyma (f) whereas EdU+ astrocyte pairs are located mostly in the upper layers (above 70% of the cortical thickness) (g). (h) All doublets found at P4-P7 are not Ki67+ cycling cells. (i) Model of astrocytic clonal maturation through inward densification between P4 and P7.

Maximal projections of 80 μm -thick sagittal sections. Means \pm s.e.m. Scale bars: 50 μm .



(légende sur la page précédente)

progéniteurs communs, et indique également qu'ils peuvent être issus de divisions locales tardives (Figure 38h-i).

Durant les analyses clonales des trois premières semaines postnatales, de nombreux doublets ont pu être observés dans des proportions stables (Figure 39a-b). Ont été catégorisées comme appartenant à des doublets les cellules sœurs dont les noyaux étaient situés à une distance inférieure à la taille d'un noyau d'astrocyte (environ 6 μm) l'une de l'autre. Or les astrocytes protoplasmiques ont une arborisation complexe formant des domaines bien supérieurs en taille à celle d'un noyau d'astrocyte et qui ne sont pas censés se recouvrir (leurs arborisations ne s'entremêlent pas, autrement dit, deux noyaux ne devraient pas être en contact) (Bushong et al., 2002, 2004). Les doublets d'astrocytes ont été considérés jusqu'à présent comme associés à leur prolifération (Ge et al., 2012), l'analyse de la prolifération des cellules sœurs était l'occasion de vérifier s'ils révèlent effectivement une activité mitotique. Alors que la prolifération des astrocytes exprimant les MAGIC Markers, visualisée grâce à l'immunomarquage des cellules en division (en phase G1, G2, S et M) contre l'antigène Ki67 baisse drastiquement entre P4 et P7 (plus aucune cellule n'étant Ki67+ à P21) (Figure 39c-d-e), le nombre de doublets, lui, reste stable. De plus ces derniers se répartissent dans tout le parenchyme cortical (Figure 39f) tandis que les astrocytes qui se sont divisés récemment se situent en majorité dans les couches supérieures du cortex cérébral (Figure 39g). D'autre part, les doublets d'astrocytes de type protoplasmique ne sont pas tous Ki67+ (Figure 39h). Dans l'ensemble, ces résultats montrent que les doublets ne sont pas caractéristiques d'une prolifération active, mais plutôt le signe d'une absence de dispersion des cellules après division.

Il semblerait donc que l'évolution des clones astrocytaires ne résulte pas uniquement d'une prolifération homogène locale et cohésive, mais au moins en partie d'une dynamique de prolifération variable selon le sous-type d'astrocyte généré, leur localisation dans le parenchyme cortical et le stade de développement. Ce processus est associé à une expansion clonale où les cellules sœurs nouvellement produites s'éloignent l'une de l'autre à des distances diminuant avec le temps, expliquant la présence des doublets même à des stades tardifs (Figure 39i).

4.1.3. Vers une analyse plus fine des phases prolifératives et dispersives de la première semaine postnatale

La première semaine postnatale représente une phase clef de prolifération, de dispersion et de densification du réseau astroglial. Pour mieux disséquer ces différentes étapes et pouvoir les analyser à l'échelle clonale, il est nécessaire de maîtriser le déclenchement de la recombinaison des MAGIC Markers à des temps précis allant de P0 à P7. Pour cela, on peut envisager l'emploi de souris transgéniques CreER chez lesquelles la recombinaison Cre est activée par injection de tamoxifène, ou encore l'électroporation d'un plasmide CreER en remplacement de la SeCre, avec activation de la Cre de la même manière par injection de tamoxifène pour recombiner les copies des transgènes électroporés intégrées au génome des cellules. La seconde stratégie, plus aisée à mettre en œuvre, a tout d'abord été mise en place. Pour cela, un plasmide préalablement existant au laboratoire a été utilisé (construction Raphaëlle Barry) : l'EBFP2, exprimée par défaut par le transgène ^{PB}Cytbow a été remplacée dans ce dernier par la recombinaison Cre inducible avec le tamoxifène (ERT2CreERT2), permettant ainsi son intégration génomique et son expression sur le long terme (Figure 40a). Grâce à cette stratégie, la recombinaison peut être contrôlée par un gavage des femelles gestantes au tamoxifène ou par injection des souriceaux après la naissance, permettant ainsi d'observer les clones formés à partir d'un temps donné, ultérieur à l'électroporation. Ce transgène a été co-électroporé avec la transposase PiggyBac à E13, puis la recombinaison a été déclenchée à P0 par injection sous-cutanée des souriceaux avec du tamoxifène et les cerveaux récupérés à P7 pour analyse (Figure 40b). Le résultat attendu est le marquage de toutes les cellules nées au temps de l'électroporation (progéniteurs, neurones) et de celles générées plus tardivement par les progéniteurs (cellules gliales) ayant reçu les transgènes et subi les effets de la recombinaison à P0. Cependant, si le patron global de marquage est conforme au résultat attendu, le marquage obtenu est majoritairement restreint à trois couleurs : rouge, vert et bleu, avec un biais dans les proportions, le rouge étant surreprésenté (Figure 40c), ne permettant pas une analyse clonale fiable basée sur des couleurs complexes.

Afin de s'affranchir de ce problème de recombinaison inégale mais également dans le but de mieux contrôler les proportions Cre/MAGIC Markers, probablement critiques pour l'obtention d'une large gamme de couleurs, la construction d'une

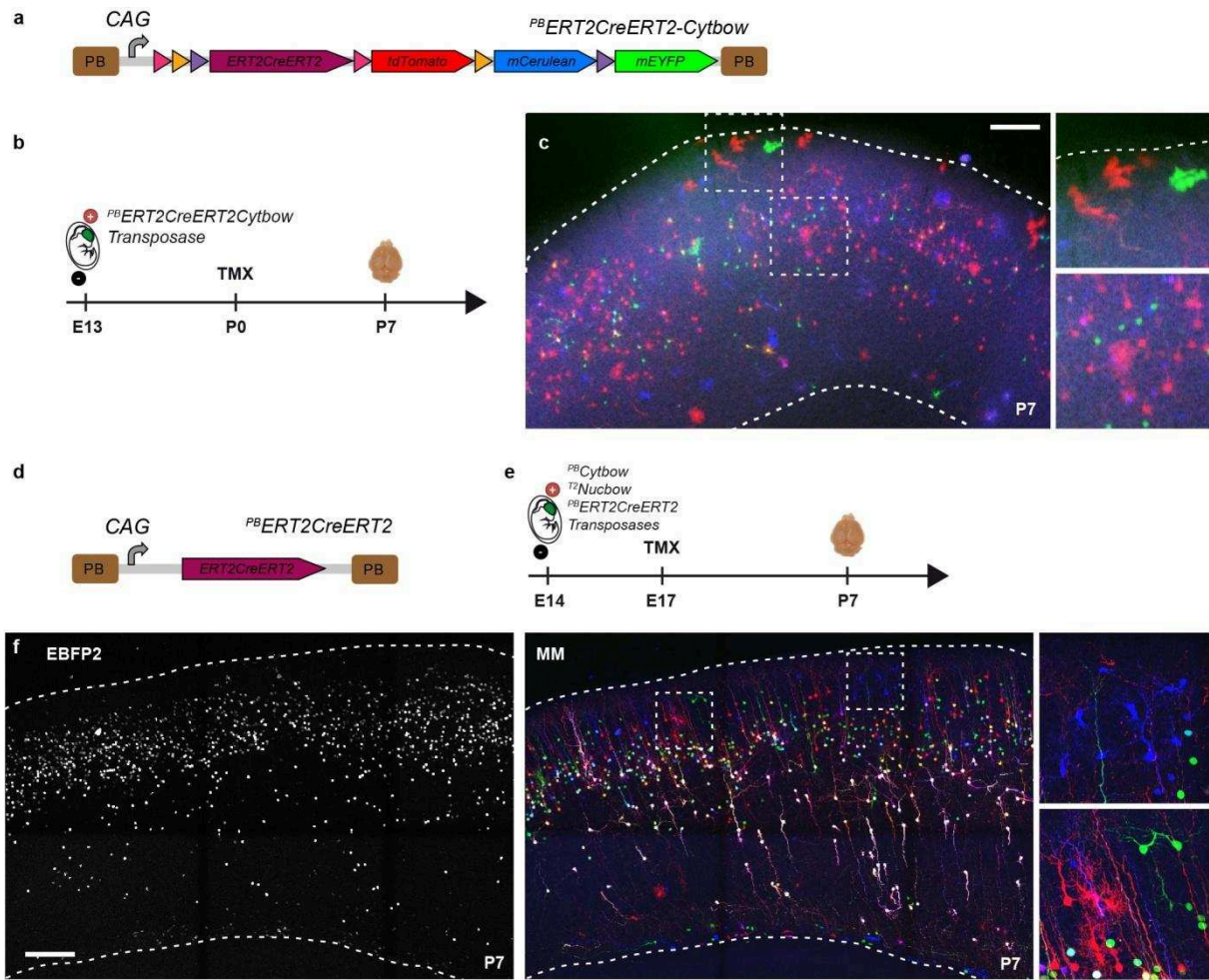


Figure 40. MAGIC Markers labeling triggered by inducible Cre strategies.

(a) Replacement of EBFP2 with ERT2CreERT2 in $PB-Cytbow$ plasmid. Tamoxifen injection induces Cre recombination (b) and multicolor labeling (c, epifluorescence image) in both neurons and astrocytes after IUE of $PB-ERT2CreERT2-Cytbow$ in cortical progenitors at E14. (d) Construction of a new integrative transgene containing the inducible form of the Cre recombinase. (e) Tamoxifen oral administration at E17 induces Cre recombination (e) and multicolor labeling in both neurons and astrocytes (f, confocal image) after IUE of both $PB-ERT2CreERT2$ and MAGIC Markers in cortical progenitors at E14.

Maximal projections of 80 μm -thick sagittal sections. Scale bars: 150 μm .

version intégrative de la recombinaise Cre inducible au tamoxifène a été réalisée ($^{PB}CAG-ERT2CreERT2$) (Figure 40d). Dans un premier temps, pour vérifier que la technique donnait les mêmes résultats qu'avec la stratégie initiale utilisant la SeCre, ce transgène a été co-électroporé avec les MAGIC Markers associés à leurs transposases respectives à E14, puis la recombinaison a été déclenchée à E17 par gavage des femelles gestantes avec du tamoxifène et les cerveaux analysés à P7 (Figure 40e). Malgré une électroporation massive, peu d'astrocytes sont marqués (Figure 40f), dans une gamme de couleurs là encore insuffisante pour réaliser des analyses clonales.

Au vu des résultats obtenus, les deux stratégies décrites ci-dessus ont été abandonnées. Dans la suite de notre étude, nos analyses se sont focalisées sur les 2 et 3^e semaines de développement postnatal en utilisant dans un premier temps l'approche MAGIC Markers classique, et dans un second temps des lignées de souris transgéniques Cre existantes.

4.2. La phase de maturation astrocytaire après la première semaine postnatale

Lors de la première semaine postnatale, le réseau astrocytaire est en pleine expansion, qui se traduit par un doublement de la taille des clones, mais également une importante dispersion des cellules générées selon les axes médiolatéral et dorsoventral. Entre P7 et P21, le nombre de cellules par clone reste stable, mais est-ce que cela signifie que le réseau est stable et figé lui aussi ? Pour répondre à cette question, des mesures de dispersion des cellules sœurs ont été effectuées, à la fois sur coupes sériées et en volume continu.

4.2.1. Dispersion des clones d'astrocytes : analyse sur coupes sériées

Que se passe-t-il entre P7 et P21 à l'échelle clonale ? L'analyse de la dispersion des clones d'astrocytes protoplasmiques selon les axes dorsoventral et médiolatéral (Figure 41a) par la méthode décrite précédemment (voir le paragraphe 4.1.1) montre une dispersion non significative des cellules sœurs selon l'axe dorsoventral (Figure 41b), et une dispersion significative selon l'axe médiolatéral (Figure 41c) entre P7 et P21, suggérant une possible expansion du réseau

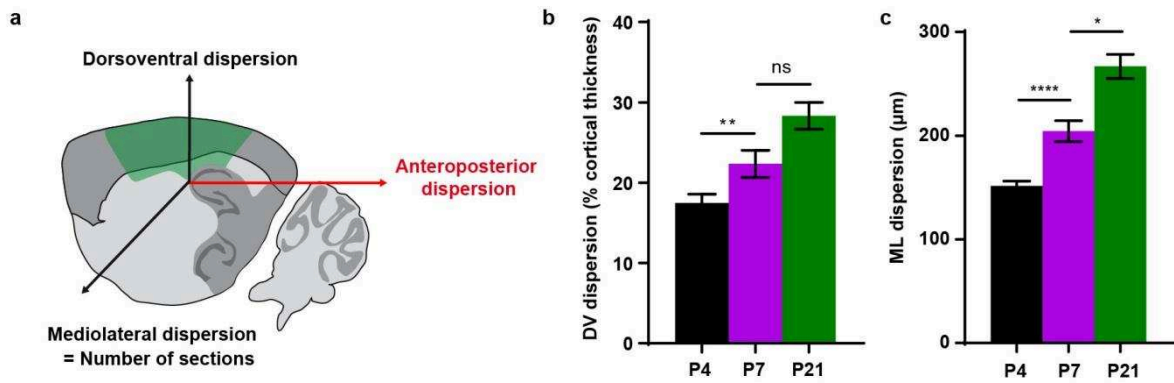


Figure 41. Dispersion of protoplasmic astrocyte clones during the three first postnatal weeks.

(a) Schematic view of protoplasmic astrocyte clones 3 axes of dispersion (DV, ML and AP). Note that AP dispersion cannot be analyzed on sagittal serial sections in 2D. (b) DV dispersion is stable from P7 to P21. (c) ML dispersion is higher at P21 than P7.

DV: dorsoventral, ML: mediolateral, AP: anteroposterior. Means \pm s.e.m.

astrocytaire au-delà de la première semaine postnatale. Cependant, l'analyse ayant été réalisée sur coupes sériées en deux dimensions, il est fort probable que la dispersion médiolatérale ait été surestimée. En effet si toutes les cellules d'un clone sont présentes sur une coupe par exemple, sa dispersion sera considérée comme égale à l'épaisseur de la coupe, soit 80 μm , alors que son organisation est peut-être plus ramassée en réalité. D'autre part, la dispersion selon les différents axes présente une grande variabilité entre clones, avec des valeurs de dispersion pouvant aller jusqu'à plusieurs centaines de micromètres, bien au-delà de l'épaisseur des coupes étudiées, biaisant de ce fait toute analyse des coupes prises individuellement (indépendamment les unes des autres). Pour finir, le marquage épars caractéristique des échantillons étudiés laisse de grandes zones essentiellement non marquées, qui rendent très difficile l'identification de points de repères nécessaires pour fusionner correctement les coupes sériées les unes aux autres. Ceci biaise particulièrement l'analyse de la dispersion des astrocytes sur l'axe antéro-postérieur, pour lequel aucune mesure relative (ratio ou nombre de coupes) ne peut par ailleurs être utilisée, mais aussi les mesures de distances en trois dimensions. Ces différentes limites techniques empêchant l'analyse tridimensionnelle précise de la dispersion des astrocytes nous ont incités à développer de nouvelles stratégies de préparation de tissus et d'imagerie permettant d'étudier des échantillons épais.

4.2.2.Elaboration d'un protocole d'imagerie multicolore tridimensionnelle

L'imagerie en grand volume doit répondre à plusieurs problématiques liées aux échantillons étudiés : i) les dimensions des cellules étudiées : les astrocytes peuvent avoir une taille supérieure à l'épaisseur de coupe maximale pour conserver un signal fluorescent satisfaisant en imagerie confocale (80 μm), ii) l'importante dispersion clonale observée précédemment, et iii) enfin les dimensions de la région étudiée : le cortex, qui s'étend sur plusieurs millimètres sur les axes dorsoventral, médiolatéral et antéropostérieur chez la souris. Pour pouvoir réaliser des études tridimensionnelles satisfaisantes dans ce contexte, il est donc nécessaire de travailler sur hémisphères cérébraux entiers ou coupes épaisses de plusieurs millimètres requérant i) une préparation adéquate des tissus (transparisation, voir le paragraphe 4.2.2.1) ou ii) un dispositif permettant d'imager une épaisseur de plusieurs centaines de micromètres de manière sériée (Chrom-STP, voir le paragraphe 4.2.2.2).

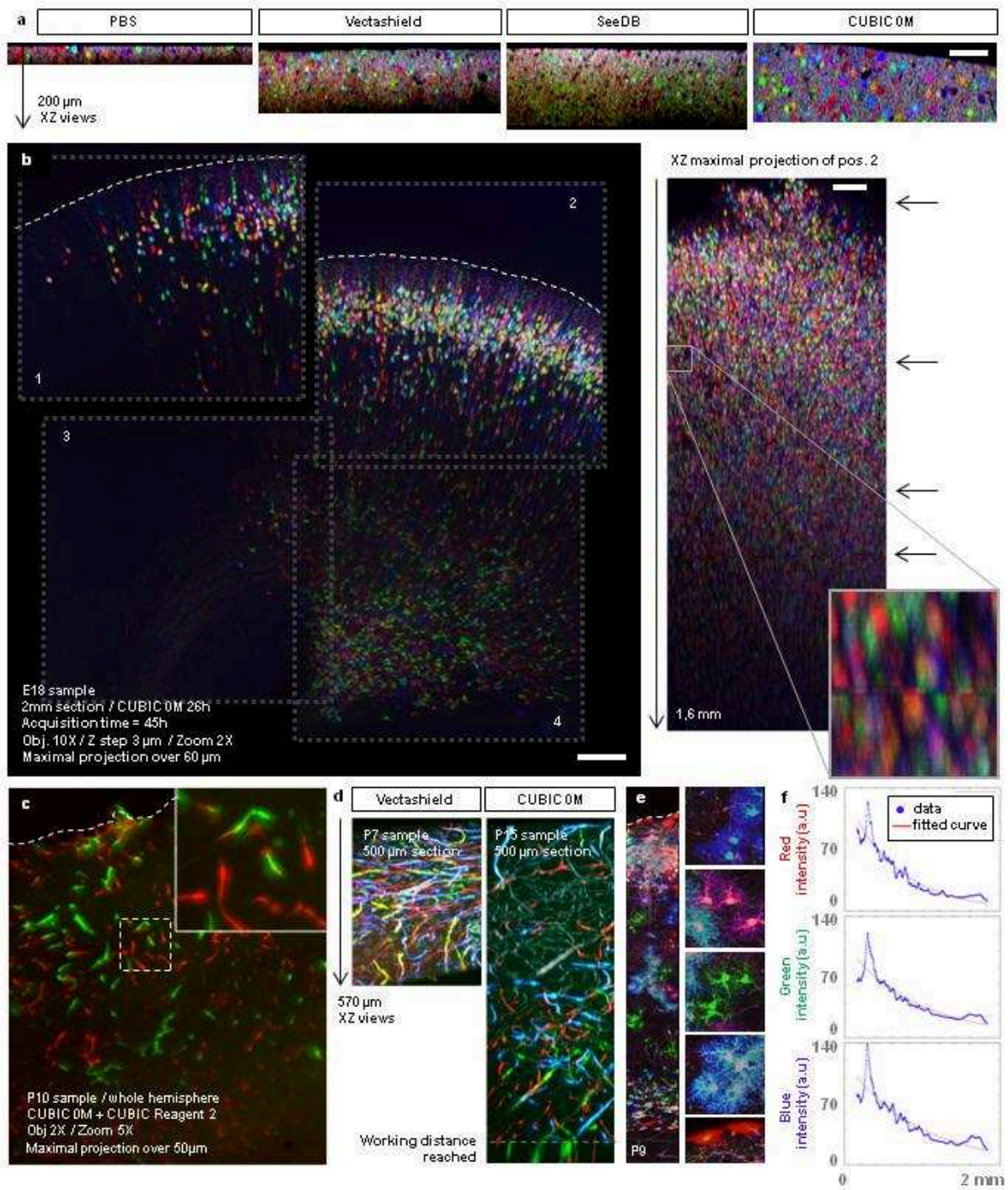
4.2.2.1. Transparisation d'échantillons multicolores

Pour imager plus en profondeur, plusieurs milieux de transparisation existants ont été testés sur des échantillons multicolores divers. Ces tests ont été effectués sur des coupes de 200 μm d'épaisseur correspondant à la distance de travail de l'objectif 20X à 0.8 N.A. huile utilisé. Trois méthodes de transparisation ont été testées dans le but de vérifier si la stabilité des trois protéines fluorescentes présentes dans les MAGIC Markers était préservée: 3DISCO (Ertürk et al., 2012; Belle et al., 2014) en collaboration avec David Godefroy, (Institut de la Vision), SeeDB (Ke et al., 2013) en collaboration avec Hanen Khabou, (Institut de la Vision) et une version modifiée du protocole CUBIC (Susaki et al., 2014) en collaboration avec Katherine S. Matho (Institut de la Vision). (Figure 42a, données non présentées). Le protocole 3Disco, engendrant une diminution importante de la taille des échantillons, s'est avéré difficile à utiliser sur des coupes suite à la rigidification de celles-ci due à la déshydratation opérée au cours du protocole : les coupes gondolent rendant l'imagerie difficile. De plus la répétition de l'imagerie à intervalles réguliers a montré une diminution du signal bleu à partir de la 16^e heure suivant la fin du protocole de transparisation (données non présentées), incompatible avec les longues acquisitions nécessaires à l'imagerie en grand volume. Concernant le SeeDB, nous avons noté que les échantillons transparisés avec ce milieu présentaient pendant l'imagerie une variation des signaux fluorescents avec la profondeur, avec par ailleurs la présence de cristaux (de fructose vraisemblablement) ajoutant du bruit de fond aux images. Enfin le CUBIC, malgré une augmentation de la taille des échantillons de l'ordre d'1,5x, procurait une bonne stabilité et un équilibre des couleurs, et ce sur toute l'épaisseur des échantillons. C'est cette dernière stratégie qui a d'abord été retenue pour l'imagerie en grand volume.

Dans un premier temps, l'imagerie a été réalisée en microscopie confocale classique (Olympus FV1000), utilisant des objectifs à eau possédant une distance de travail de plusieurs millimètres. Des coupes de 2 mm ont été effectuées, puis incubées à 37°C sous agitation dans la solution modifiée « CUBIC 0M » pendant 24h à une semaine suivant l'âge des animaux, avec renouvellement quotidien des solutions. Ces coupes ont ensuite été montées dans le CUBIC 0M à l'intérieur d'une chambre délimitée par des bandes de téflon, entre lame et lamelle, scellée avec du ciment dentaire pour garantir son herméticité, l'acquisition se déroulant dans une

cuve remplie d'eau (les objectifs à eau ont souvent des ouvertures numériques élevées et de longues distances de travail et permettent de surmonter les problèmes d'aberrations chromatiques). L'acquisition mosaïque d'une coupe de 2 mm d'épaisseur d'un échantillon à E18 a mis en évidence plusieurs problèmes. Premièrement la fusion complète des différents champs est impossible (Figure 42b), soit parce que l'échantillon, ramolli par le protocole CUBIC, bouge pendant l'acquisition, soit parce que l'épaisseur imagée est trop importante pour que la platine mobile du microscope revienne précisément à son point de départ à chaque changement de champ. Deuxièmement, l'échantillon s'opacifie entre le début et la fin de l'acquisition (Figure 42b, champ 1 à 4) même avec nombre de champs réduit (4 ici, contre une dizaine nécessaire au minimum pour un échantillon P7 par exemple), probablement en partie parce que l'échantillon et son milieu de transparisation ne sont plus à 37°C. De fait, malgré le protocole de transparisation, l'intensité du signal récupéré diminue beaucoup avec la profondeur (Figure 42b) et les images présentent des discontinuités (Figure 42b, flèches), ainsi que des aberrations chromatiques (boîte). Troisièmement, la courbure du cortex impose d'imager de nombreuses piles d'images dans lesquelles le marquage n'est présent qu'en début ou fin d'acquisition, augmentant considérablement les temps d'imagerie (compter 11h par champ). Du fait de ces limites techniques, cette stratégie n'a pas été poursuivie.

Pour diminuer les temps d'acquisition et s'affranchir du problème de fusion de champs, l'imagerie à feuilles de lumière a également été envisagée. Les échantillons ont été transparisés selon le protocole CUBIC sur hémisphère entier puis imagés avec un ultramicroscope (LaVision BioTec, logiciel InspectorPro, longueurs d'ondes disponibles 488 et 561 nm) en collaboration avec David Godefroy (Institut de la Vision) (Figure 42c). Cependant, cette stratégie d'imagerie a également été abandonnée car la résolution obtenue avec l'objectif disponible est incompatible avec des analyses à l'échelle des noyaux des cellules et d'importantes aberrations chromatiques sont générées par l'objectif, nécessitant une mise au point manuelle sur la feuille de lumière pour chaque longueur d'onde (contrairement au confocal où l'image est toujours dans le plan focal).



(légende sur la page suivante)

Figure 42. Clearing and imaging strategies for multicolor large volume analysis.

(a) 200 μm thick serial sections from adult multicolor mice mounted in various media following clearing protocols using PBS and Vectashield as controls, SeeDB and CUBIC 0M as clearing media. Imaging in PBS enables to detect signal over a few dozens of micrometers, whereas Vectashield, SeeDB and CUBIC 0M improve the depth of signal detection. Among these two last, CUBIC 0M was the one preserving the most the signal of the three fluorescent proteins. (b) E18 2 mm multicolor section cleared with CUBIC 0M and imaged with a confocal microscope as a 4 fields mosaic (60 μm maximal projection). Field n°2 was resliced in Z to observe signal attenuation in depth, chromatic aberrations (box) and image discontinuities (arrows). (c) P10 multicolor whole hemisphere cleared with CUBIC 0M and imaged with an ultramicroscope (LaVision BioTec, lmspectorPro software, available wavelengths 488 and 561 nm) shows low cellular resolution and chromatic aberrations. (d) 500 μm of young mouse multicolor samples cleared with Vectashield or CUBIC 0M and successfully imaged using a two photon-microscope until the 25X objective working distance was reached. (e) New two photon-microscope set-up allows multicolor imaging of a P9 2 mm section cleared with CUBIC 0M over 2 mm in depth, with signal attenuation (f).

Scale bars: 100 μm .

La microscopie bi-photonique étant plus performante que la microscopie confocale pour imager en profondeur et notre collaboration avec l'équipe d'Emmanuel Beaurepaire (Ecole Polytechnique, Palaiseau) ayant déjà permis d'imager des échantillons multicolores de cortex murin postnatal jusqu'à 370 μm d'épaisseur (Mahou et al., 2012; Loulier et al., 2014), nous nous sommes tournés vers cette stratégie pour les essais suivants. Les premiers tests réalisés avec Nelly Vuillemin, (Ecole Polytechnique, Palaiseau) sur des coupes de 500 μm dans le Vectashield ou transparisées avec le protocole CUBIC pendant une semaine montrent une bonne détection des signaux RVB jusqu'à ce que la distance de travail (1 mm) de l'objectif (25X, glycérol) soit atteinte (Figure 42d). L'utilisation d'un autre objectif permet d'aller plus en profondeur (25X, 1.05 N.A., eau) (Figure 42e). Cependant l'analyse de l'intensité du signal en fonction de la profondeur montre une atténuation non négligeable (Figure 42f) pouvant biaiser les analyses clonales et nécessitant de limiter la profondeur d'acquisition pour conserver une intensité de signal homogène sur toute l'épaisseur du tissu. Ces limites techniques nous ont poussés à écarter les stratégies d'imagerie d'échantillons entiers transparisés au profit d'un dispositif associant microscope bi-photonique et découpe série automatique.

4.2.2.2. Validation d'un dispositif associant microscope bi-photonique et coupe automatique

Pour répondre aux problématiques d'atténuation du signal avec la profondeur, mais aussi pour obtenir des images de meilleure qualité, sans déformation des cellules ou perte de signal liées au protocole de transparencisation, la construction d'un dispositif associant microscopie bi-photonique multicolore mosaïque (Mahou et al., 2012) et découpe sériée automatique avec un microtome à lame vibrante (Ragan et al., 2012) a été réalisée par l'équipe d'Emmanuel Beaufrais (LOB, Ecole Polytechnique), et en particulier grâce au travail de Lamiae Abdeladim en thèse dans son équipe, en étroite collaboration avec Katherine S. Matho (Institut de la Vision). Avec ce dispositif, l'échantillon est imagé « en face » sur une centaine de micromètres de profondeur (suivant son âge et la structure étudiée, myélinisée ou non) de manière mosaïque, puis sectionné sur une épaisseur inférieure à celle imagée (environ 80-90 μm). Des cycles successifs d'acquisition/découpe permettent d'imager le volume complet de manière continue sans aucune perte de matériel. Les différents blocs sont ensuite fusionnés ensemble, avec le logiciel Fiji grâce à leur recouvrement partiel. Cette approche dénommée Chrom-SMP (Chromatic Serial MultiPhoton) a permis notamment d'imager des échantillons de cortex cérébral murin adulte (P65) électroporés à E15 avec le marqueur $^{PB}Cytbow$ sur 4,8 mm^3 de manière continue avec une taille de voxel de 0,4x0,4x1,5 μm^3 (Abdeladim et al. en révision, article en annexe). Les séries de données ainsi générées permettent d'analyser les caractéristiques colorimétriques et morphologiques des astrocytes corticaux en grand volume, tout en conservant une échelle micrométrique, ouvrant la voie à l'étude de la dispersion tridimensionnelle des clones d'astrocytes marqués avec l'approche MAGIC Markers au cours du développement.

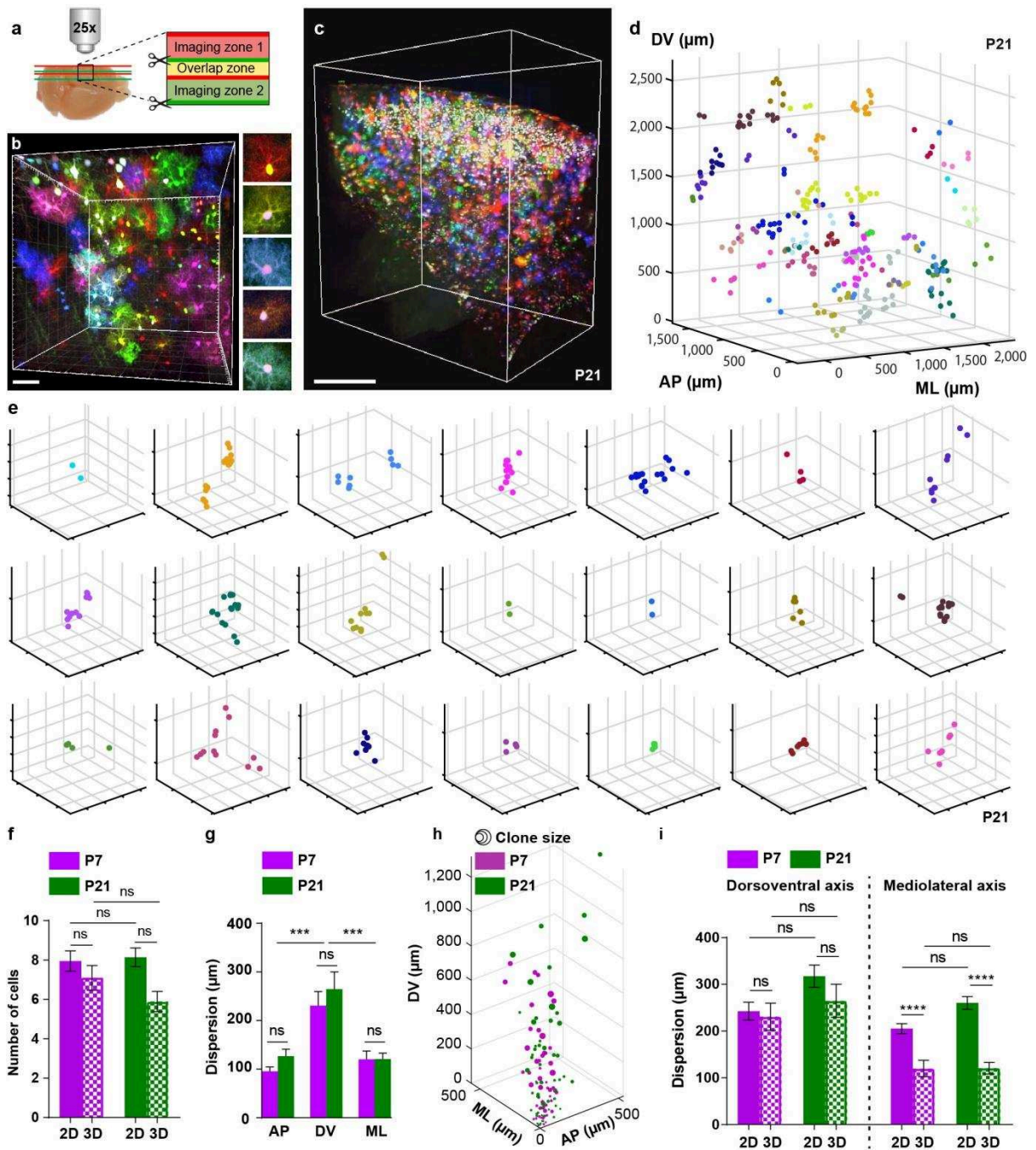
4.2.3. Analyses clonales tridimensionnelles

Grâce à l'approche microscopique Chrom-SMP (Figure 43a), des échantillons de cortex cérébral murin électroporés avec les MAGIC Markers à E15 dans les conditions décrites précédemment ont pu être imagés sur plus de 8 millimètres cubes (Figure 43b-c). Nous avons ainsi pu analyser un grand nombre de clones définis par des combinaisons rares de couleurs avec un nombre d'animaux réduit âgés de 7 ou 21 jours (2 animaux par stade de développement étudié). Pour l'analyse, les images ont été traitées en utilisant le logiciel TrakEM2 (Cardona et al., 2012) dont la

visualisation plan par plan permet l'ouverture de fichiers d'un volume supérieur à celui de la mémoire de travail de l'ordinateur utilisé car nous obtenons des séries de données allant au-delà de la centaine de giga octets. Les astrocytes ont ensuite été pointés manuellement au niveau du centre du noyau dans l'espace XYZ. La taille des clones obtenue est similaire à celle observée avec la stratégie d'analyse sur coupes sériées (Figure 43f), validant a posteriori cette méthode précédemment employée. Grâce à l'approche Chrom-STP, nous pouvons à présent étudier la dispersion et l'organisation tridimensionnelles des clones d'astrocytes selon les 3 axes dorsoventral – anteropostérieur – médiolatéral sans perte de matériel.

4.2.3.1. Dispersion 3D

Comment les cellules sœurs se positionnent-elles en trois dimensions (3D) dans le parenchyme cortical ? La position XYZ de chacune des cellules des clones analysés a été déterminée (Figure 43d, série de donnée d'un animal P21 où 37 clones ont été inventoriés) permettant de caractériser leur distribution spatiale (Figure 43e). La dispersion maximale sur chaque axe (dorsoventral, médiolatéral et l'axe anteropostérieur manquant dans les analyses précédentes sur coupes sériées) a été mesurée (respectivement $Y_{min}-Y_{max}$, $Z_{max}-Z_{min}$ et $X_{max}-X_{min}$). Cette analyse montre une dispersion importante des clones d'astrocytes protoplasmiques, pouvant aller jusqu'à plusieurs centaines de micromètres et qui demeure stable entre P7 et P21 sur chacun des trois axes (Figure 43g). Il en va de même pour la dispersion relative (dispersion absolue divisée par le nombre de cellules par clones ; données non présentées). La dispersion des clones est par ailleurs plus élevée selon l'axe dorsoventral, ce qui semble compatible avec le mode de développement de type colonnaire avancé par une étude précédente (Magavi et al., 2012). L'étude de la distribution de la dispersion globale en 3D montre encore une fois une grande variabilité selon les clones, et ce indépendamment de leur taille (Figure 43h). Alors que les analyses sur coupes sériées semblaient montrer une légère augmentation de la dispersion clonale entre P7 et P21, les données 3D suggèrent au contraire qu'elle reste stable pendant cette période. Les données 2D et 3D ont été comparées afin d'expliquer cette différence de résultats (Figure 43i). La dispersion dorsoventrale ayant été évaluée à partir des coupes 2D en utilisant des ratios (voir le paragraphe 4.1.1), ces derniers ont été multipliés par l'épaisseur moyenne du cortex cérébral (en μm) mesurée sur chaque animal afin de les comparer aux distances obtenues en 3D.



(légende sur la page suivante)

Figure 43. Astrocyte clone dispersion analysis with multicolor Chrom-SMP imaging.

(a) Imaging scheme for continuous multicolor high resolution acquisitions and astrocyte visualization with Chrom-SMP (b) in large volume of cerebral cortex (c). (d) Example of a $1,5 \times 2,5 \times 2,5 \text{ mm}^3$ P21 sample labeled through MAGIC Marker electroporation of cortical progenitors at E15 with manual segmentation of cell XYZ coordinates, allowing large scale clonal analysis (e). (f) Clone size is similar when estimated using 2D serial sections or 3D analysis. (g) Maximal dispersion of protoplasmic astrocyte clones along the AP, DV and ML axes shows no difference from P7 to P21, along with a wider dispersion in the DV axis. (h) This dispersion is variable at both studied developmental stages, regardless to clone size. (i) Comparison of serial section (2D) and large volume (3D) analysis reveals that ML dispersion was overestimated when the serial section strategy was used.

DV: dorsoventral, ML: mediolateral, AP: anteroposterior. Means \pm s.e.m. Scale bars: (b) 50 μm , (c) 500 μm .

Cette comparaison donne des valeurs de dispersion dorsoventrale similaires à partir des données 2D et 3D. En revanche, la dispersion médiolatérale est quant à elle, surestimée sur les coupes sériées, vraisemblablement à cause des paliers de 80 μm (épaisseur des coupes) utilisés pour la mesurer. Les données en 3D, présentant moins de biais techniques que les mesures en 2D, permettent de soutenir une absence de dispersion clonale entre P7 et P21.

Quelles formes ont les clones astrocytaires ? Présentent-ils une morphologie stéréotypée ou variable ? Pour aller plus loin dans l'analyse de la dispersion des clones d'astrocytes protoplasmiques, et en particulier pour mieux connaître leur géométrie, la triangulation de Delaunay a été utilisée (Delaunay, 1934). Appliquée à un ensemble de points (ici des cellules sœurs) répartis dans un espace en trois dimensions, cette triangulation est telle qu'aucun point ne se retrouve à l'intérieur de la sphère circonscrite d'un des tétraèdres de la triangulation. Les triangulations de Delaunay maximisent le plus petit angle de tous les angles des triangles de la triangulation. Les sphères circonscrites des tétraèdres du réseau sont ainsi vides, c'est-à-dire qu'elles ne contiennent pas d'autres sommets que ceux de leur tétraèdre. Cela permet de construire un maillage dans lequel les distances entre les points (astrocytes) peuvent être étudiées de proche en proche. La triangulation de Delaunay en 3D est possible à partir de 4 points, les clones d'astrocytes protoplasmiques de 4 cellules ou plus ont donc été analysés de cette manière. Pour

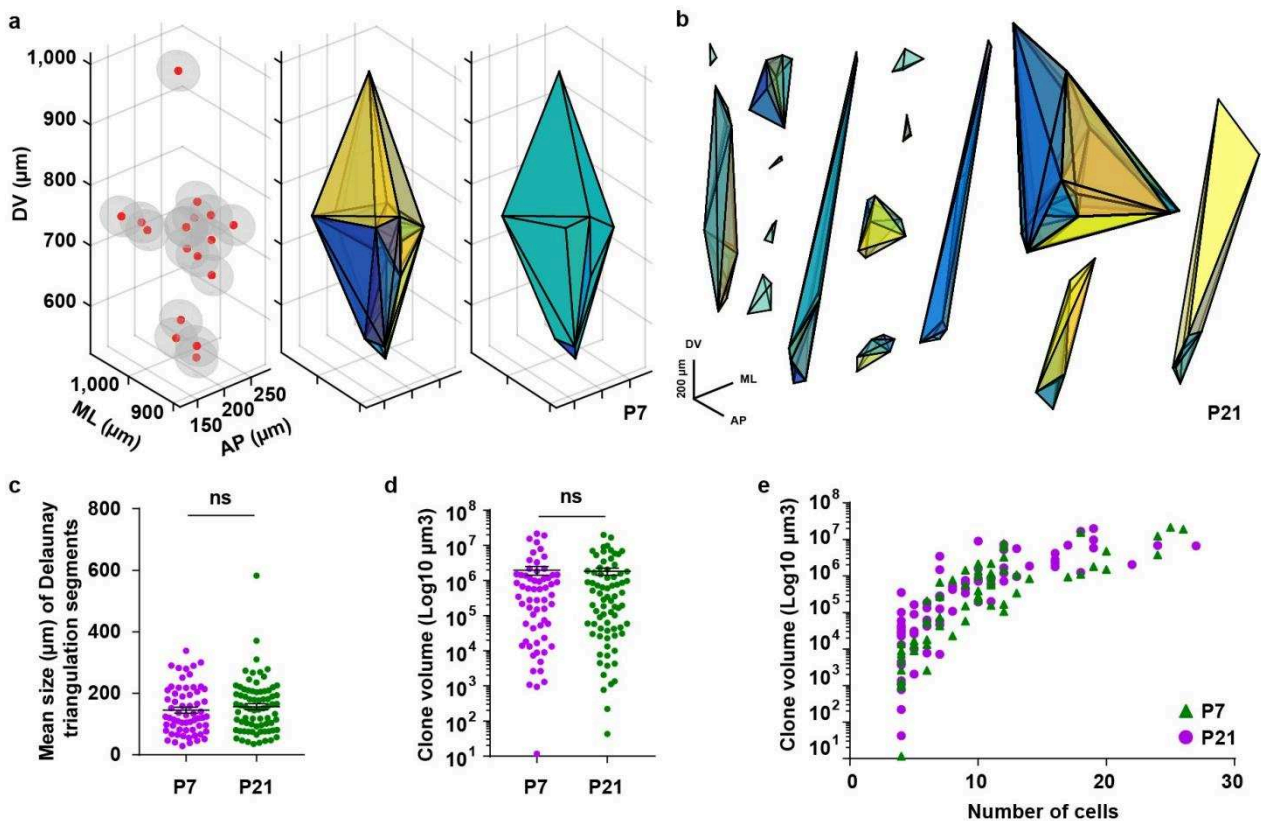


Figure 44. Tridimensional analysis of astrocyte clone dispersion and volume using Delaunay triangulations.

(a) Left panel: 3D plot of a P7 astrocyte clone with nuclei in red and cell bodies in grey (mean sizes). Delaunay triangulation was applied to 3D coordinates (middle panel) followed by a ConvexHull representation (right panel). (b) Delaunay triangulations provide information on astrocyte clone shapes and their variability. (c) Mean size of Delaunay triangulation segments within each clone shows no cell spacing over time. (d) ConvexHull volume analysis shows no difference of clone volume from P7 to P21, with a high variability, and a volume globally increasing with clone size (e).

DV: dorsoventral, ML: mediolateral, AP: anteroposterior. Means \pm s.e.m.

les clones de 2 cellules, nous avons simplement mesuré la distance entre les cellules et pour les clones de 3 cellules, l'aire du triangle formé par les cellules. Dans ces deux cas, aucune évolution n'a été observée entre P7 et P21, indiquant une absence de dispersion pour ces catégories clonales (données non présentées). Pour chaque clone de 4 cellules ou plus, à partir des coordonnées XYZ des cellules sœurs (Figure 44a), les triangulations de Delaunay ont été calculées et visualisées sur Matlab, puis les polyèdres correspondant aux segments extérieurs de la triangulation (appelés ConvexHulls) ont été générés afin d'en extraire le volume. Les rendus obtenus montrent une grande variabilité dans la géométrie des clones (Figure 44b), avec un grand nombre de clones allongés (dans le sens dorsoventral), rappelant les résultats de dispersion globalement colonnaire obtenus précédemment. La forme globale des clones en dit peu sur leur composition interne. De quelle manière les cellules sœurs sont-elles positionnées les unes par rapport aux autres ? Sont-elles toutes ou partiellement interconnectées ? Pour étudier l'espacement des cellules entre elles, la moyenne de la taille en μm de tous les segments formés par chaque triangulation a été calculée ($75 \mu\text{m}$). Cette mesure ne montre aucune différence entre P7 et P21, signifiant une absence d'éloignement des cellules les unes par rapport aux autres (Figure 44c). Le volume clonal, obtenu grâce aux ConvexHulls, témoigne quant à lui d'une très grande variabilité entre les clones, ne montre également aucune différence entre P7 et P21 (Figure 44d), et semble globalement lié au nombre de cellules par clone (Figure 44e).

Si ces résultats montrent une certaine stabilité du réseau entre P7 à P21 à l'échelle clonale, ils ne disent pas comment les clones sont organisés à celle des astrocytes individuels. En particulier la connectivité entre cellules sœurs peut être le reflet de la manière dont le réseau se met en place par des mécanismes de migration et de prolifération locale.

4.2.3.2. Organisation

Les observations effectuées sur des images en microscopie confocale montrent des clones très variables dans leur composition et comprenant soit des groupes ramassés, soit des colonnes et/ou de cellules isolées (Figure 45a). De quelle manière les clones d'astrocytes protoplasmiques s'organisent-ils ? Cette organisation est-elle stéréotypée ? Toutes les cellules d'un même clone sont-elles en contact les unes avec les autres ? Afin de répondre à ces questions, nous nous

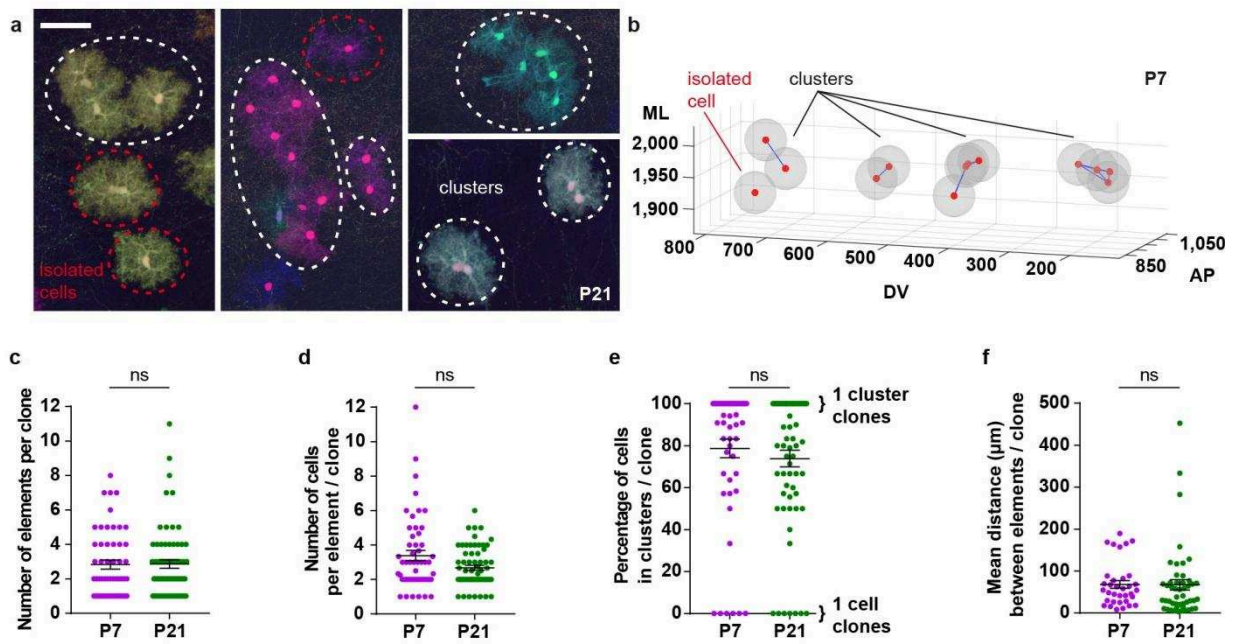


Figure 45. Tridimensional organization of clonally –related cells in the cerebral cortex.

(a) Maximal projections of 80 μm -thick sections imaged with confocal microscopy, revealing clusters (white groups) or isolated cells (red) within protoplasmic astrocyte (PrA) clones at P21. (b) Tridimensional connectivity diagram of sister cells connected through blue lines in a P7 sample. (c) Connectivity analysis of sister cells shows that PrA are composed of 3 elements (clusters, isolated cells or mix of both) on average, with no difference between P7 and P21. (d) Within clones, mean size of elements is 3 cells at both P7 and P21, with 75% of the cells belonging to clusters (e). (f) On average, clone elements are spaced by 80 μm apart starting from their branching extremities.

DV: dorsoventral, ML: mediolateral, AP: anteroposterior. Means \pm s.e.m. Scale bar: 50 μm .

sommes intéressés à la connectivité des clones d'astrocytes (c'est-à-dire aux juxtapositions ou discontinuités entre les domaines des astrocytes composant un clone) à différents stades de développement. En collaboration avec Dragos Niculescu, post-doctorant dans l'équipe, des mesures de taille de cellules (pour chaque stade de développement étudié) ont été utilisées pour déterminer automatiquement, à partir des coordonnées XYZ des cellules sœurs, le degré de connectivité au sein des clones : toute cellule située à une distance supérieure au double du rayon moyen d'un astrocyte + sa déviation standard est considérée comme "déconnectée" de sa voisine. Ces calculs révèlent l'organisation suivante (Figure 45b) : les clones sont composés de 3 éléments en moyenne (groupes d'astrocytes connectés ou cellules isolées) (Figure 45c) comprenant eux-mêmes en moyenne 3 cellules (Figure 45d). Presque 80% des cellules appartiennent à un groupe de deux cellules ou plus (Figure 45e). Les cellules isolées sont finalement rares. La distance moyenne entre les éléments d'un clone (située entre les extrémités des cellules qui les composent) est de 80 μm environ (soit l'équivalent du diamètre d'un astrocyte, arborisation comprise) (Figure 45f), ce qui témoigne d'un éloignement plutôt restreint. De tous les paramètres étudiés, aucun ne varie entre P7 et P21, attestant à nouveau de la stabilité d'un réseau astrocytaire formé de clones hétérogènes dans leur organisation structurelle. Cela signifie-t-il que le réseau astrocytaire est mature et figé dès la fin de la première semaine postnatale ? Les analyses à l'échelle des clones semblent donner une réponse affirmative à cette question, mais qu'en est-il à l'échelle des cellules individuelles ?

5. Maturation des astrocytes à l'échelle de la cellule après la première semaine postnatale

Si les résultats précédents ne montrent aucun réarrangement cellulaire de P7 à P21, il est possible que les cellules subissent des changements morphologiques affectant leur taille ou leur complexité. Lors des analyses clonales en 2D, il semblait que les astrocytes à P21 étaient plus grands et plus ramifiés que ceux observés à P7. Ces paramètres ont donc été approfondis.

5.1. Analyses volumétriques d'astrocytes

De quelle manière les astrocytes protoplasmiques corticaux évoluent-ils morphologiquement au cours du développement ? Pour étudier les astrocytes protoplasmiques à l'échelle cellulaire après la première semaine postnatale, des analyses volumétriques ont été effectuées. A partir des images obtenues avec l'approche Chrom-SMP, des astrocytes isolés ont été segmentés afin de mesurer le volume de leur domaine en suivant le protocole utilisé par Abdeladim et al. (en révision, voir le paragraphe 4.2.2.2). Brièvement, les iso-contours des astrocytes sont dessinés plan par plan sur Imaris et permettent de générer des surfaces dont le volume interne est calculé après suppression des éléments déconnectés (Figure 46a). Les segmentations effectuées obtenues à P7 et P21 montrent une augmentation de 65% du volume cellulaire entre P7 et P21 (Figure 46b-c) avec une grande variabilité intercellulaire (Figure 46d-e). A P21, la taille des cellules se stabilise, elle est équivalente à celle observée chez l'adulte (Figure 46c) (Abdeladim et al., en révision, en annexe). Le volume des astrocytes protoplasmiques varie avec leur localisation dans les différentes couches corticales (Figure 46f), avec des cellules plus petites situées à proximité de la surface piaie (bin 1) et du corps calleux (bin 6). L'observation de l'extension maximale des prolongements astrocytaires dans les axes dorsoventral, antéropostérieur et médiolatéral (Figure 46g), montre respectivement une augmentation de 9%, 9% et 15% respectivement entre P7 et P21 (Figure 46h). Or si l'on considère que les astrocytes protoplasmiques sont des ellipsoïdes dont on calcule le volume théorique (Figure 46i), ces augmentations de taille au niveau des extrémités devraient conduire à un accroissement de volume de 35% entre P7 et P21, et non de 65% comme celui observé. Cela signifie que l'allongement des extrémités des prolongements astrocytaires, ne peut, à lui seul, expliquer la variation de volume observée entre P7 et P21. Pour disséquer les changements morphologiques astrocytaires à l'échelle de leurs branchements, qui pourraient expliquer cette augmentation de volume, des analyses à plus forte résolution ont été effectuées.

5.2. Analyse de la complexité des branchements astrocytaires

Comment évoluent les ramifications astrocytaires au cours du développement cortical ? En collaboration avec Gilles Bonvento et Edwin Hernandez (Cea, Fontenay aux Roses), la complexité des branchements astrocytaire a été étudiée. Les images

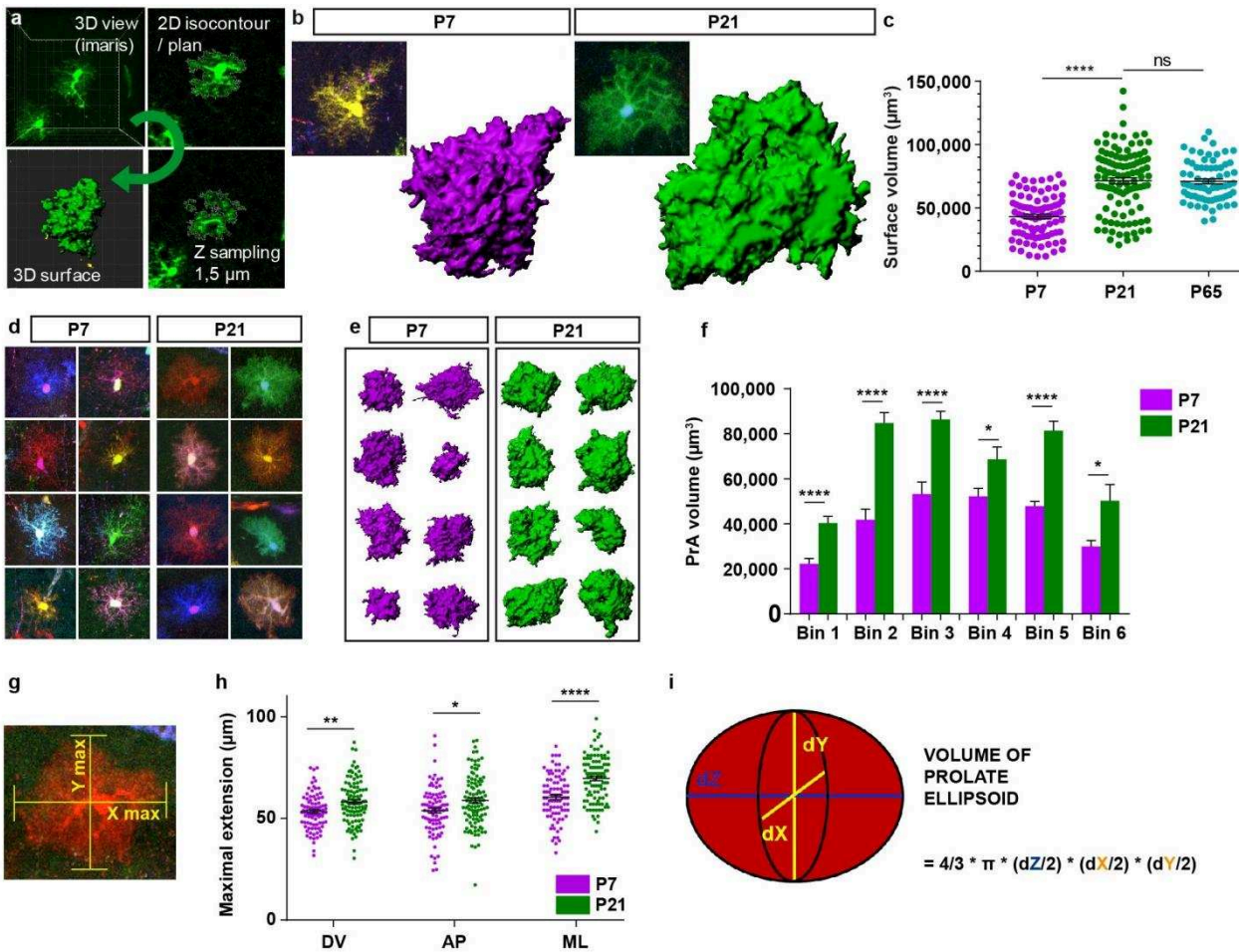


Figure 46. Cellular volume of cortical protoplasmic astrocytes.

(a) Semi-automatic segmentation of protoplasmic astrocytes (PrA) using Imaris software on Chrom-SMP imaged samples: semi-automatic isocontour is drawn on each z plan from which a 3D surface with a given volume is generated. Disconnected elements (in yellow) are excluded. (b) PrA surface rendering at P7 and P21 shows a volume increase of 65% from P7 to P21 (c). Multiple surface volume analysis on the entire cortical thickness (d-e) shows high individual variability and within layers (f) where Bin 1 is the closest to the pial surface. (d) Measurement of the maximal extension of PrA branching in the Y, X and Z axis shows an increase of 9%, 9% and 15% in the DV, AP and ML axis respectively between P7 and P21. (i) Considering PrA as ellipsoids, this increase in cell dimensions should lead to a 35% volume increase, whereas a 65% increase was observed on PrA individual segmentations.

Means ± s.e.m.

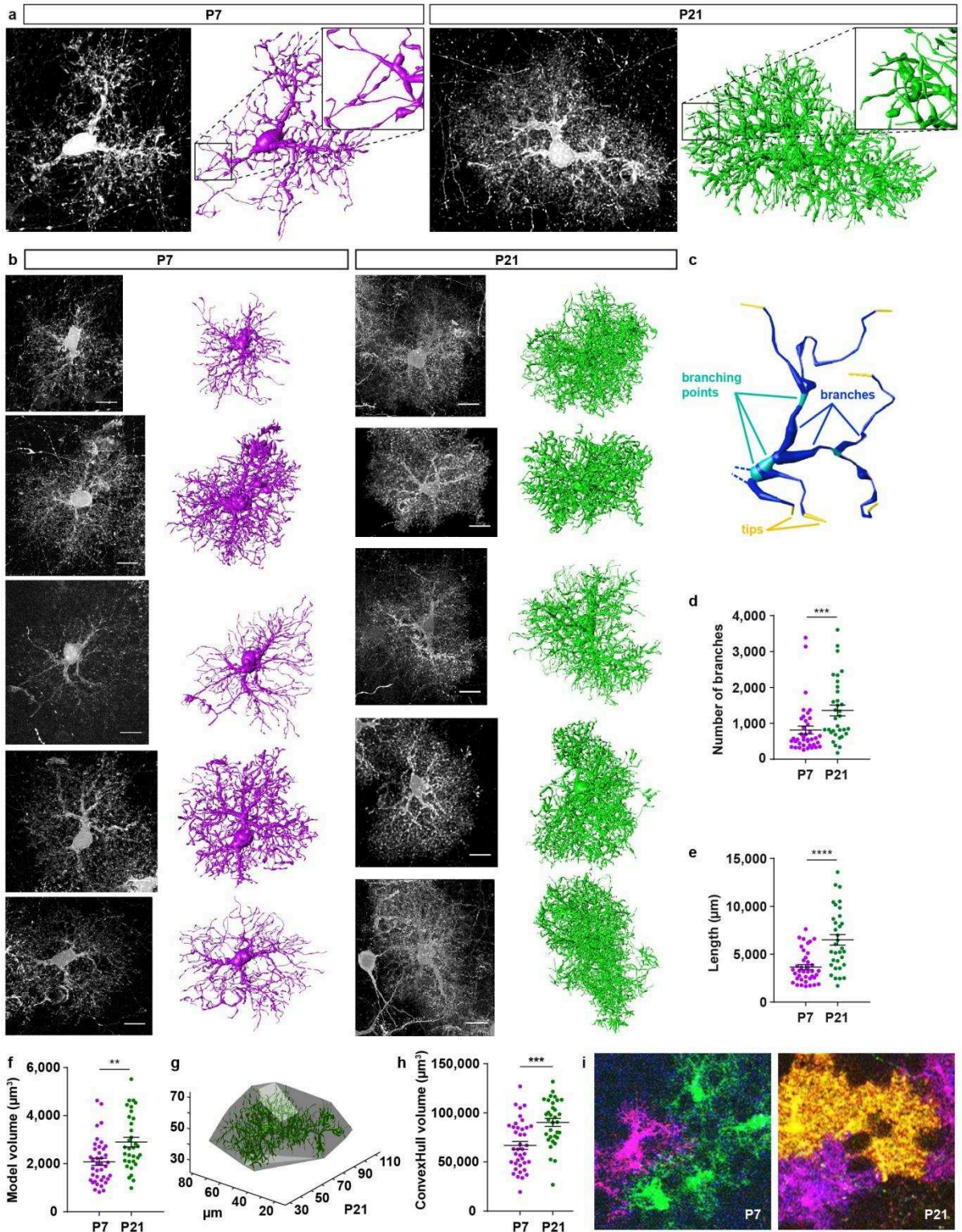
et les données présentées ci-après sont le résultat du travail d'Edwin Hernandez. Des astrocytes protoplasmiques isolés ont été imagés à fort grossissement à l'aide d'un microscope confocal pourvu d'un objectif 63X 1.4 N.A sur des coupes de 80 μm d'épaisseur de cortex cérébral murin issues d'animaux électroporés avec les MAGIC Markers à E15 et âgés de 7 ou 21 jours. Puis, après déconvolution et réduction du bruit de fond, les cellules ont été reconstruites automatiquement avec Vaa3D-Neuron2 Auto Tracing (Peng et al., 2014) et les informations (nombre de branches, intersections, volume etc.) du modèles ont été extraites avec L-measure (Scorcioni et al., 2008).

Les reconstructions obtenues à P7 et P21 permettent de bien visualiser les fines branches qui constituent le domaine astrocytaire (Figure 47a) et dont la densité varie parmi les cellules modélisées (Figure 47b). Les informations concernant le nombre de branches, de terminaisons et d'intersections peuvent ainsi être extraites (Figure 47c). Cette analyse révèle une augmentation du nombre de branches, de 800 à 1400 entre P7 et P21 (Figure 47d) et de leur longueur totale (mises bout à bout) (Figure 47e), témoignant d'un accroissement de la complexité des terminaisons astrocytaires entre les deux stades étudiés. Des travaux récemment publiés confirment ces conclusions (Stogsdill et al., 2017). Le volume du modèle augmente lui aussi (Figure 47f), de même que le volume du ConvexHull du modèle (Figure 47g-h) confirmant les résultats précédemment obtenus avec les segmentations d'astrocytes protoplasmiques en 3D (voir le paragraphe 5.1). Le réseau astrocytaire cortical est donc établi de manière stable dès P7, mais s'ensuit une période de maturation à l'échelle cellulaire au cours de laquelle les astrocytes augmentent à la

Figure 47. High resolution protoplasmic astrocyte morphology analysis.

(a) Protoplasmic astrocyte (PrA) reconstruction with Vaa3D-Neuron2 Auto Tracing software following 63X confocal imaging is efficient to study astrocyte branching. (b) Morphologies and branching were heterogeneous among individual astrocytes. (c) Analysis of branching level reveals an increase in both branches number and length from P7 to P21 (d-e). (f) PrA reconstruction volume analysis shows a volume increase between these two stages as well as the ConvexHull volume calculation (g-h). (i) Single z plans of PrA clusters show that contrary to P7 PrA, P21 PrA branching fill the entire cortical space, leaving neuron nuclei visible.

Images and reconstructions: Edwin Hernandez. Means \pm s.e.m. Scale bars: 10 μm .



(légende sur la page précédente)

fois la couverture de leur territoire et la complexité de leur arborisation, ce qui se traduit par un “remplissage” plus important de l’espace cortical (Figure 47i).

Cette première partie a permis de mettre en évidence la manière dont le réseau astrocytaire s’établit au cours du développement cortical murin grâce à une stratégie d’analyse multiclonale. Les progéniteurs corticaux génèrent des clones hétérogènes en termes de composition (taille, sous-types d’astrocytes), de positionnement et de dispersion, qui s’imbriquent avec leurs voisins au cours d’une phase dynamique de prolifération et de dispersion pendant la première semaine postnatale, aboutissant à une densification du réseau astroglial. S’ensuit une phase de maturation morphologique à l’échelle cellulaire. La grande variabilité observée au sein des clones demeure inexplicée. Les sources potentielles diverses d’astrocytes décrites dans la littérature, et dont la contribution à la formation du réseau astroglial est encore débattue (Tabata, 2015) peuvent-elles être à l’origine de cette variabilité et de cette hétérogénéité ? Cette question est abordée dans la seconde partie de ces travaux.

PARTIE 2 : Caractérisation des sources de production des astrocytes corticaux

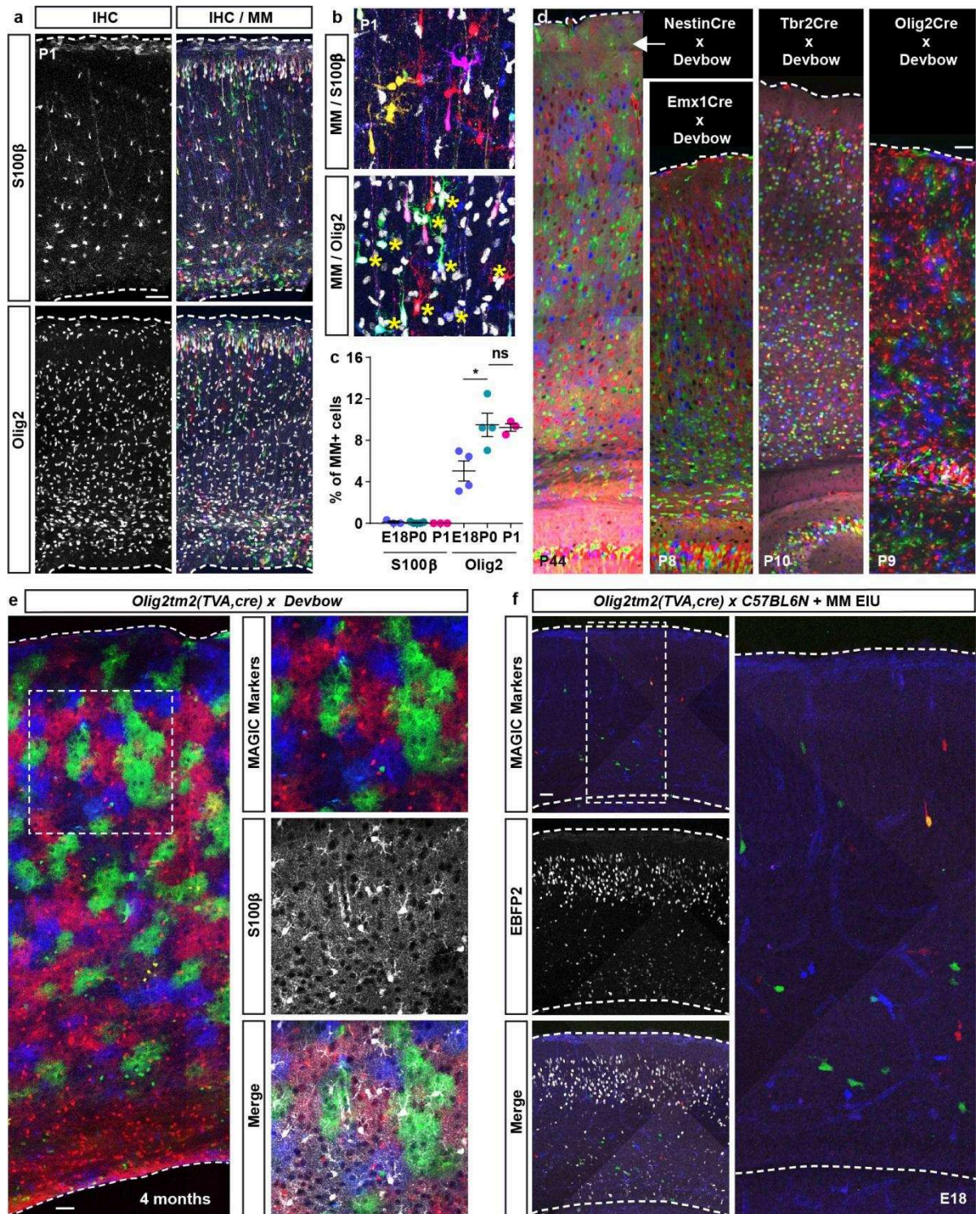
Un peu plus d'un siècle de recherches sur la glie, et en particulier sur les astrocytes, ont permis de décrire différentes sources d'astrocytes corticaux chez les mammifères, dont les cellules souches neurales embryonnaires et leur descendance qui ont fait l'objet des analyses présentées dans la première partie, mais également d'autres sources qui sont encore débattues aujourd'hui telles que les cellules Olig2+ et les progéniteurs de la zone sous ventriculaire postnatale. Les outils de suivi du lignage cellulaire multicolore dont nous disposons (lignées transgéniques, électroporations des MAGIC Markers) permettent d'aborder ces questions controversées à l'échelle des populations cellulaires et des progéniteurs individuels. Elles seront traitées dans cette seconde partie.

1. Le facteur de transcription Olig2 : marqueur précoce du lignage astrocytaire cortical

Des études du lignage des cellules Olig2+, longtemps présumées précurseurs d'oligodendrocytes uniquement, semblent montrer que ces cellules progénitrices des zones ventriculaires et sous ventriculaires donnent également naissance à des astrocytes corticaux (Cai et al., 2007; Ono et al., 2008). Dans quelle mesure le lignage Olig2 contribue-t-il à la formation du réseau astrocytaire et à quel stade de développement ce facteur de transcription est-il impliqué ?

1.1. Olig2 : marqueur précoce d'astrocytes corticaux

En quête de l'origine de la variabilité de la composition, de l'organisation structurelle et de l'évolution des clones astrocytaires corticaux chez la souris, nous nous sommes attachés à remonter aux premiers instants de l'astrogliogenèse afin d'observer les premiers astrocytes générés à la fin de l'embryogenèse et analyser leur morphologie et leur positionnement dans le parenchyme cortical. Pour cela, les MAGIC Markers ont été électroporés dans les progéniteurs corticaux à E15 et les cellules marquées ont été analysées par marquage immunohistochimique à E18, P0 et P1 (Figure 48a). A ces stades précoces, la morphologie peu ramifiée des cellules multicolores rend en effet impossible la discrimination neurone / astrocyte /



(légende sur la page suivante)

Figure 48. *Olig2* transcription factor is an early marker of cortical astrocytes.

(a-b-c) IUE of MAGIC Markers in E15 cortical progenitors shows colocalization of multicolor cells with *Olig2* marker (5-10%) from E18 to P1 and none with S100 β at these early stages. (d) Sagittal sections of P44 *NestinCre;Devbow* and P8 *Emx1Cre;Devbow* mice show neuronal and glial labeling in the cerebral cortex while the labeling obtained in sagittal section of P10 *Tbr2Cre;Devbow* mice is exclusively neuronal and in *Olig2^{tm2(TVA,cre)Rth};Devbow* exclusively glial, with both pial and protoplasmic like cells clearly identifiable. Images: Karine Loulier & Takuma Kumamoto. (e) 4 months-old *Olig2^{tm2(TVA,cre)Rth};Devbow* animals display astrocyte coverage of the entire cerebral cortex. (f) IUE of MAGIC Markers in E13 *Olig2^{tm2(TVA,cre)Rth}* cortical progenitors labels very few and sparse recombined cells with undetermined morphologies at E18 even though numerous cells express MAGIC Markers (EBFP2) in absence of Cre action.

Maximal projections over 80 μ m-thick sections. Means \pm s.e.m. Scale bars 40 μ m.

oligodendrocyte sur la base d'une analyse morphologique. Aucun co-marquage MAGIC Markers / S100 β n'est détecté entre E18 et P1 dans le néocortex malgré la présence de cellules S100 β + dès E18 (Figure 48b-c), confirmant que ce marqueur caractérise les astrocytes tardifs et par conséquent déjà matures. A la recherche d'autres marqueurs immunohistochimiques permettant de marquer précocement les astrocytes corticaux, nous nous sommes intéressés au facteur de transcription *Olig2* dont plusieurs études indiquent l'expression dans les astrocytes corticaux (Marshall et al., 2005; Ono et al., 2008; Tatsumi et al., 2018). De manière intéressante, 5% des cellules MAGIC Markers+ expriment *Olig2* à E18, et cette proportion augmente jusqu'à 10% à P0 et P1 (Figure 48a-b-c). De plus ces cellules MAGIC Markers+/*Olig2*+ présentent une morphologie ramifiée dans la plaque corticale, distincte des neuroblastes bipolaires. Ont-elles un devenir astrocytaire dans le cortex de souris adulte ?

1.2. Les astrocytes générés par le lignage *Olig2* proviennent des progéniteurs de la zone ventriculaire dorsale

Afin de déterminer si les astrocytes protoplasmiques sont bien issus du lignage *Olig2*, nous avons croisé des souris de la lignée *Olig2^{tm2(TVA,cre)Rth}* (Schüller et al., 2008) où la recombinaison Cre est activée dans les cellules qui expriment *Olig2* à un moment de leur développement avec de nouvelles souris rapportrices multicolores générées dans l'équipe à partir des MAGIC Markers. Ces souris *CAG-TCytbow;CAG-Nucbow*, ou « *Devbow* » sont issues du croisement de deux lignées

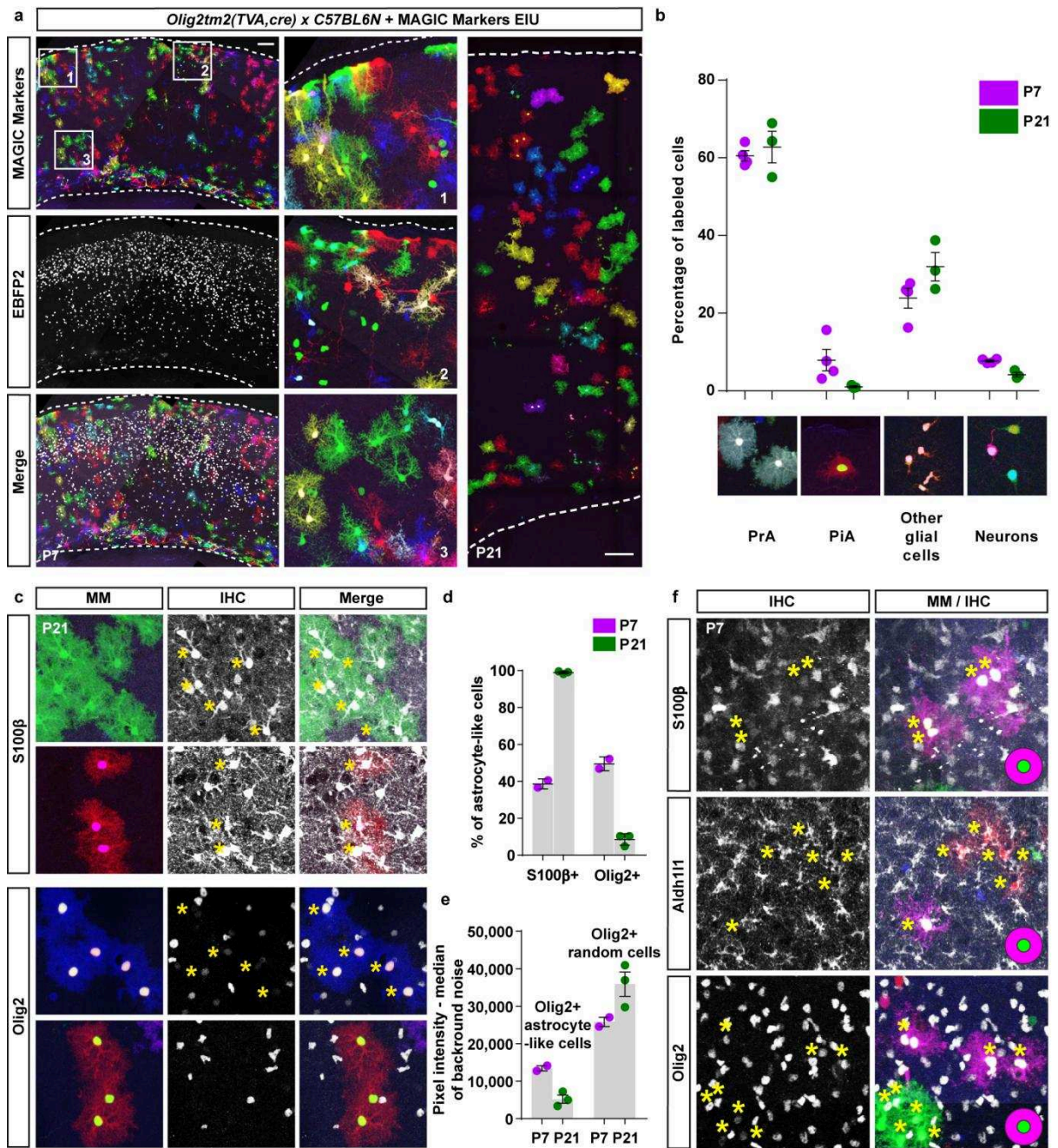
transgéniques exprimant respectivement les transgènes *Cytbow* et *Nucbow* sous contrôle du promoteur *CAG*. Elles présentent un marquage multicolore conditionné par la recombinaison *Cre/lox*. Des croisements contrôlés, réalisés par Karine Loulier et Takuma Kumamoto (Institut de la Vision) ont été effectués pour vérifier le profil d'expression multicolore obtenu avec des lignées *Cre* bien caractérisées. Le croisement des souris *Devbow* avec une lignée exprimant *Cre* sous contrôle du promoteur de la Nestine (*Nestin^{Cre};Devbow*), une protéine des filaments intermédiaires de classe VI exprimée dans les cellules souches neurales (Mori et al., 2005) marque comme attendu les neurones et les cellules gliales dans tout le parenchyme cortical et à la surface piaie (Figure 48d). Un résultat similaire est obtenu avec le croisement *Emx1^{Cre};Devbow*, dans lequel la recombinaison est dirigée par le gène *Emx1*, un facteur de transcription à homéoboîte spécifique du pallium dorsal qui joue un rôle dans la prolifération des cellules souches neurales, la différenciation de neurones spécifiques des couches corticales et l'engagement vers un lignage neuronal ou glial (Yoshida et al., 1997; Puelles et al., 2000; Schuurmans and Guillemot, 2002). En revanche, comme attendu, avec le croisement *Tbr2^{Cr};Devbow* (T-box brain-2, spécifique des progéniteurs neuronaux intermédiaires de la zone ventriculaire et sous ventriculaire (Arnold et al., 2008), seuls les neurones sont marqués. Les souris obtenues à partir du croisement *Olig2^{tm2(TVA,cre)Rth};Devbow* présentent quant à elles un marquage glial non restreint aux oligodendrocytes dans le cortex cérébral, avec des cellules possédant une morphologie d'astrocytes piaux et protoplasmiques à des stades postnataux. Cette nature astrocytaire est confirmée à des stades plus tardifs avec un immunomarquage qui montre que 80% de ces cellules expriment également S100β (Figure 48e).

Pour vérifier que ces astrocytes sont bien générés à partir de progéniteurs corticaux dont la descendance exprime à un moment donné *Olig2*, les MAGIC Markers ont été électroporés dans des embryons *Olig2^{tm2(TVA,cre)Rth}* (Figure 48f). A E18, ces embryons présentent déjà quelques cellules multicolores réparties dans tout le parenchyme cortical après une électroporation massive visualisée grâce aux cellules non recombinées EBFP2+. Cependant, à ce stade, la morphologie des cellules recombinées ne permet pas de déterminer leur future identité et elles sont encore en faible proportion. Les animaux ont ensuite été récupérés à des stades plus tardifs du développement, à P7 et P21. Ils présentent alors un marquage astrocytaire important

dans le parenchyme et à la surface piale, avec des cellules sœurs visibles appartenant aux deux sous-types protoplasmique et pial (Figure 49a). Ces résultats confirment que les astrocytes corticaux, protoplasmiques et piaux, sont bien générés à partir des progéniteurs de la zone ventriculaire dorsale et qu'ils expriment Olig2 à un stade de leur développement.

Grâce à leur morphologie, la nature des cellules MAGIC Markers+ a été déterminée : elles comprennent 61% d'astrocytes protoplasmiques, 5% d'astrocytes de la surface piale, 27% d'autres cellules gliales et 6% de neurones (Figure 49b). L'identité astrocytaire des cellules de type protoplasmique a été vérifiée par marquage immunohistochimique contre l'antigène S100 β (Figure 49c). Les résultats montrent que les cellules MAGIC Markers+ issues du lignage Olig2 sont toutes S100 β + à P21 (Figure 49d) alors que seulement 40% le sont deux semaines plus tôt, une dynamique qui s'inverse pour le marquage Olig2 où 50% des cellules de type protoplasmique sont encore Olig2+ à P7 mais seulement 8% deux semaines plus tard. Ces résultats confirment que le lignage Olig2, via les progéniteurs de la zone ventriculaire dorsale, génère des astrocytes dont l'expression d'Olig2 diminue avec le temps. Cette interprétation est appuyée par le fait que l'intensité du marquage Olig2, mesurée grâce aux analyses de pixels sur les cellules Olig2+ de type protoplasmique ou Olig2+ contrôles (cellules correspondant à toutes les cellules Olig2+ d'un champ donné, sans distinction de morphologie), diminue entre P7 et P21 pour les astrocytes protoplasmiques alors qu'elle augmente chez les cellules contrôles (Figure 49e). Des immunomarquages sur des coupes adjacentes présentant chacune quelques cellules sœurs appartenant à un même clone montrent de plus une co-expression des MAGIC Markers avec S100 β , Aldh1l1 (aldehyde dehydrogenase 1 family member L1, marqueur spécifique des astrocytes) et Olig2 à P7 (Figure 49f).

L'ensemble de ces résultats montre que l'expression d'Olig2 est partagée par une grande majorité des progéniteurs d'astrocytes corticaux et ne semble donc pas être un facteur associé à la variabilité observée à l'échelle clonale au sein du réseau astrocytaire. Se pourrait-il que cette variabilité provienne alors de leur origine embryonnaire ou postnatale?



(légende sur la page suivante)

Figure 49. Olig2 derived astrocytes arise from dorsal cortical progenitors.

(a) IUE of MAGIC Markers in E13 *Olig2^{Cre}* cortical progenitors results in the labeling of astrocyte-like cells of both protoplasmic (PrA) and pial (PiA) subtypes at P7 and P21 with 61%, 5%, 27% and 6% of labeled cells belonging to PrA, PiA, other glial cells and neurons respectively (b), according to their morphology. (c) S100 β and Olig2 immunostainings at P7 and P21 show that 40% of astrocyte-like cells are S100 β + at P7 and 98% at P21 whereas the production of astrocyte-like cells expressing Olig2 marker reaches 50% at P7 and decreases to 8% at P21 (d). (e) Pixel intensity analysis of Olig2+ cells (c) show that MAGIC Marker+ labeled Olig2+ astrocyte-like cells have a lower Olig2 signal comparing to random cells and that these levels decrease from P7 to P21 while they increase in random cells. (f) Immunostainings show colabeling of MAGIC Markers+ sister cells with S100 β , Aldh111 and Olig2 at P7 in adjacent sections.

Maximal projections over 80 μ m-thick sections. Means \pm s.e.m. Scale bars: 100 μ m.

2. Contribution des progéniteurs postnatals au lignage astrocytaire

La communauté scientifique s'interroge toujours sur la potentielle contribution des progéniteurs de la zone sous ventriculaire postnatale au réseau astrocytaire cortical (Levison and Goldman, 1993; Burns et al., 2009; Ge et al., 2012) (voir à ce sujet le paragraphe 3.4.2 de l'introduction). Les outils de lignage dont nous disposons (lignées transgéniques, électroporations des MAGIC Markers) permettent d'aborder la question de la contribution des progéniteurs postnatals au lignage astrocytaire cortical, mais aussi d'étudier comment le réseau se construit au cours du développement à partir des cellules nouvellement générées après la naissance.

2.1. Génération d'astrocytes corticaux par la zone sous ventriculaire dorsale postnatale

Les travaux les plus récents (Ge et al., 2012) montrent une absence de production d'astrocytes par ces progéniteurs postnatals. Pour aller plus loin dans la description du développement du réseau astroglial cortical, confirmer ou infirmer ce résultat était une étape importante. Cette question a donc été abordée avec les nouveaux outils en notre possession. Pour s'affranchir de la dilution des marqueurs au cours des divisions, un vecteur intégratif (Tol2CAGmEYFP) a été co-électroporé avec un vecteur épisomal contrôle (CAG-RFP) à P1 dans des souris sauvages et le marquage obtenu a été observé à P7 (Figure 50a). Seul un marquage faible

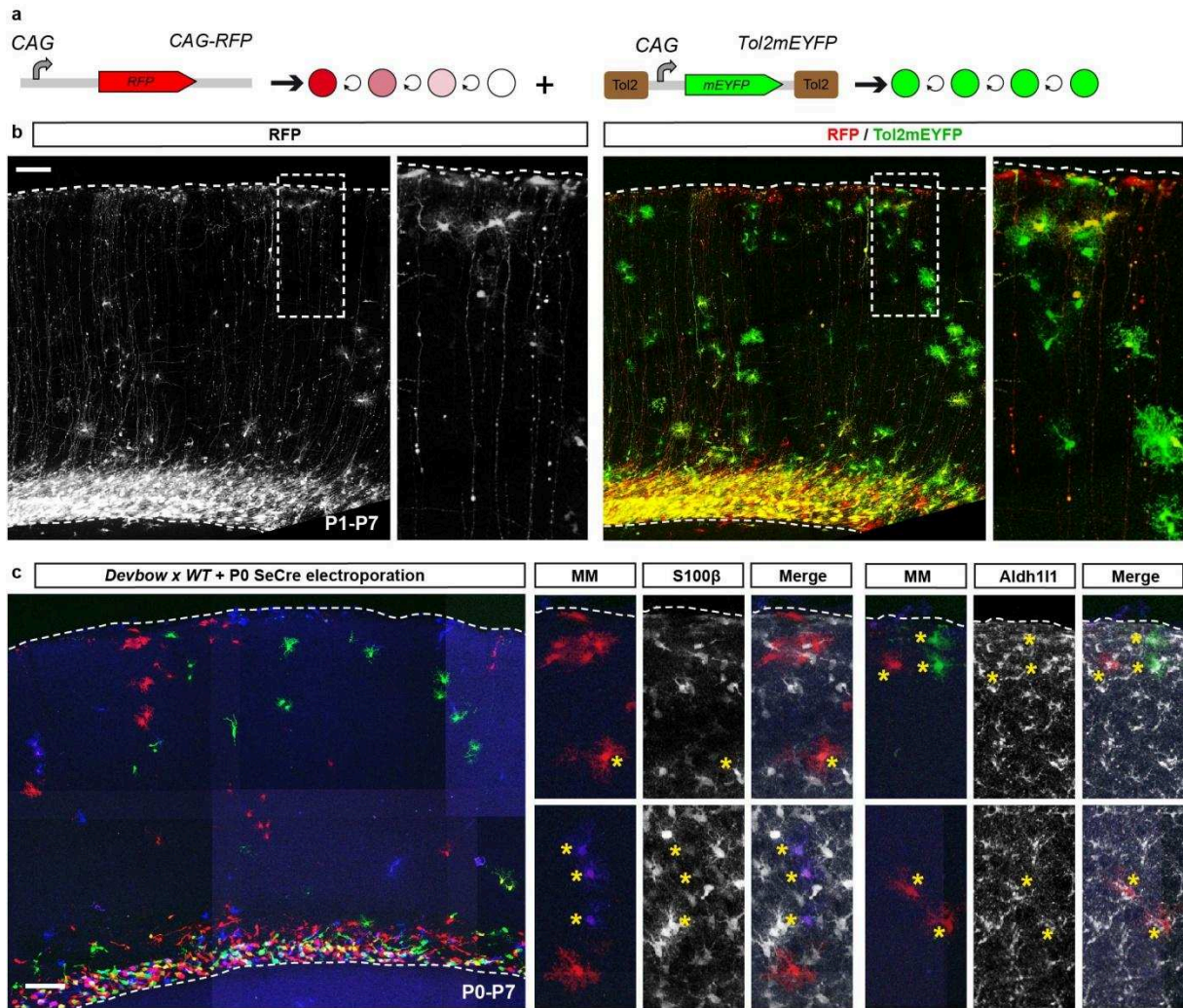


Figure 50. Contribution of postnatal SEZ progenitors to the generation of cortical astrocytes.

(a) P1 co-electroporation of episomal CAG-RFP and integrative Tol2mEYFP vectors labels few astrocytes expressing RFP and markedly more expressing Tol2mEYFP at P7 (b). Labeled cells, of both pial and protoplasmic astrocyte subtypes are found in all cortical layers. (c) P0 electroporation of SeCre plasmids in *Devbow* mice labels cortical astrocytes which form clonal groups and are identified by S100 β or Aldh1L1 immunostaining at P7.

Maximal projections over 80 μ m-thick sections. Scale bars 100 μ m.

d'astrocytes de types protoplasmique et pial est observé avec les vecteurs épisomaux (Figure 50b) alors que les vecteurs intégratifs marquent beaucoup plus de cellules et de manière plus intense (Figure 50c). L'électroporation de la SeCre dans des souris *Devbow* à P0 confirme que des astrocytes sont générés par des progéniteurs bordant le ventricule après la naissance et indique par ailleurs que ces cellules forment des groupes clonaux à P7 (Figure 50c). L'identité astrocytaire de ces cellules a été confirmée par des marquages immunohistochimiques révélant les antigènes S100 β et Aldh1l1. De plus, la contribution du lignage Olig2 au réseau astrocytaire n'est pas restreinte aux progéniteurs corticaux embryonnaires car des astrocytes générés à partir des progéniteurs postnatals sont également marqués par l'électroporation des MAGIC Markers dans des souris *Olig2^{tm2(TVA,cre)Rth}* à P0 (données non présentées). Ces résultats montrent par conséquent que la contribution postnatale des progéniteurs de la zone sous ventriculaire dorsale est loin d'être négligeable, et révèle également que ces cellules se divisent vite et un nombre de fois suffisant pour diluer des marqueurs non intégrés lors de la genèse du réseau astrocytaire.

Pour disséquer l'étape de colonisation du cortex par les précurseurs astrocytaires, le vecteur intégratif Tol2CAG-mEYFP a été électroporé dans des souris sauvages soit avant la naissance (E15, contrôle) soit le jour de la naissance, et les échantillons récupérés 48 à 72h après. Un co-marquage immunohistochimique contre Olig2 et Aldh1l1 a été effectué pour vérifier l'identité astrocytaire des cellules observées (Figure 51). L'expérience contrôle montre que dès E18, des cellules co-exprimant ces deux marqueurs sont visibles dans les couches supérieures du cortex cérébral (Figure 51a), confirmant la contribution prénatale des progéniteurs corticaux au réseau astroglial et révélant que les astrocytes générés migrent rapidement vers la surface piale. Dès 48h après électroporation postnatale (Figure 51b-c), des astrocytes sont retrouvés dans la partie supérieure du cortex cérébral, et davantage 72h après. Ils migrent rapidement et sans apparente localisation préférentielle colonisant ainsi le parenchyme cortical de manière homogène (avec un espacement régulier). Ce type de répartition homogène paraît propice à un agrandissement du réseau par prolifération locale et avec une dispersion limitée.

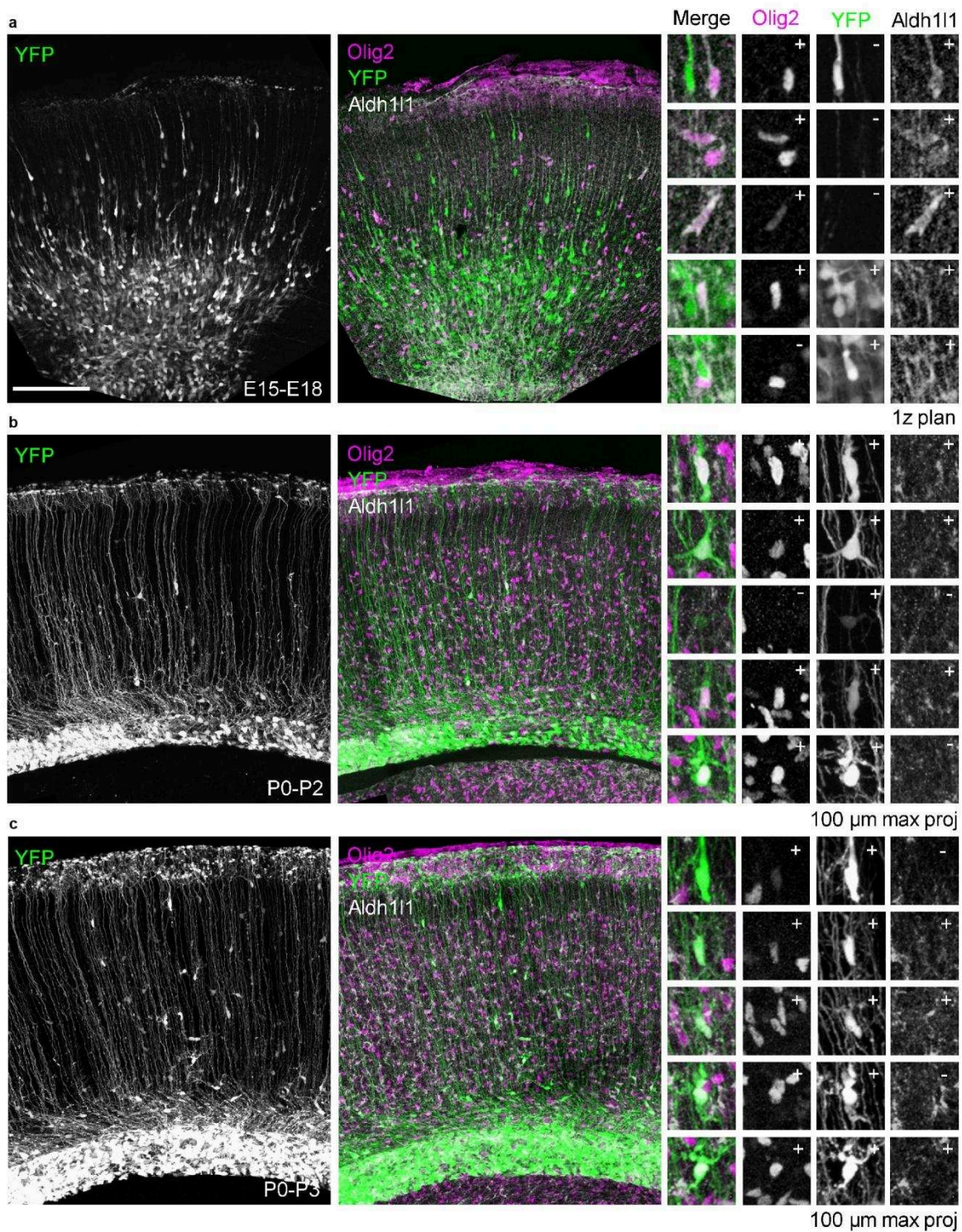


Figure 51. Astrocytes scatter in the embryonic cortical parenchyma.

(a) IUE of integrative Tol2CAGmEYFP vector in E15 cortical progenitors show labeled cells and Aldh11+/Olig2+ cells in the upper part of the cortical parenchyma at E18. (b) Postnatal electroporation of integrative Tol2CAGmEYFP vector in P0 cortical progenitors displays astrocytes (Olig2+/Aldh11+) in the cortical parenchyma at P2 and P3 (c), showing a rapid colonization of the cortical parenchyma.

Maximal projections over 80 μm-thick sections. Scale bar: 150 μm.

2.2. Contribution postnatale des cellules Nestin+ au réseau astrocytaire

Pour obtenir plus d'informations sur le lignage des astrocytes générés après la naissance, les souris *Devbow* ont été croisées avec des souris *Nestin-Cre/ERT2* (*C57BL/6-Tg(Nes-cre/ERT2)KEisc/J*) (Lagace et al., 2007) où l'injection de tamoxifène permet de déclencher la recombinaison et dans les cellules Nestin+ et d'obtenir un marquage multicolore de leur descendance à un stade précis défini par l'expérimentateur. Une étude publiée antérieurement (Burns et al., 2009) et des expériences préliminaires utilisant des marquages immunohistochimiques ayant montré que la Nestine ne colocalise pas avec des marqueurs astrocytaires S100 β et GFAP dans le parenchyme cortical (données non présentées) indiquent que les astrocytes matures n'expriment pas la Nestine et nous ont initialement laissé supposer que les effets des injections de tamoxifène durant la première semaine postnatale seraient restreints aux cellules progénitrices Nestin+. Comme attendu, les résultats ne montrent aucun marquage à P7 en l'absence de tamoxifène (données contrôles non présentées). En revanche, après une injection unique de tamoxifène à P0, P2, P3, P4 ou P5, un marquage des progéniteurs et des neurones est observé dans la zone sous ventriculaire, le RMS (Rostral Migratory Stream), le bulbe olfactif et le gyrus denté de l'hippocampe (Figure 52a). Sont de plus visibles dans le parenchyme cortical des astrocytes, dont l'identité est confirmée par co-marquage avec S100 β . Le nombre de cellules générées de type astrocytaire appartenant aux deux sous-types pial et protoplasmique diminue de manière importante entre P0 et P5 (Figure 52b) pour atteindre quelques cellules seulement. Des cellules Nestin+ contribuent donc à la formation du réseau astrocytaire durant la première semaine postnatale, mais dans quelles proportions par rapport aux cellules générées aux stades embryonnaires ?

Nous avons développé une approche pour tenter de distinguer les deux contributions pré et postnatales à la construction du réseau astroglial. Nous avons pour cela combiné l'électroporation *in utero* à E15 d'un vecteur intégratif Tol2CAG-mEYFP (marquant en vert les astrocytes issus de la contribution pré-natale) et l'utilisation de souris transgéniques *RosaSTOPtdTomato* (Madisen et al., 2010) ; *Nestin-CreERT2* (*B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Hze/J*) (aussi appelées

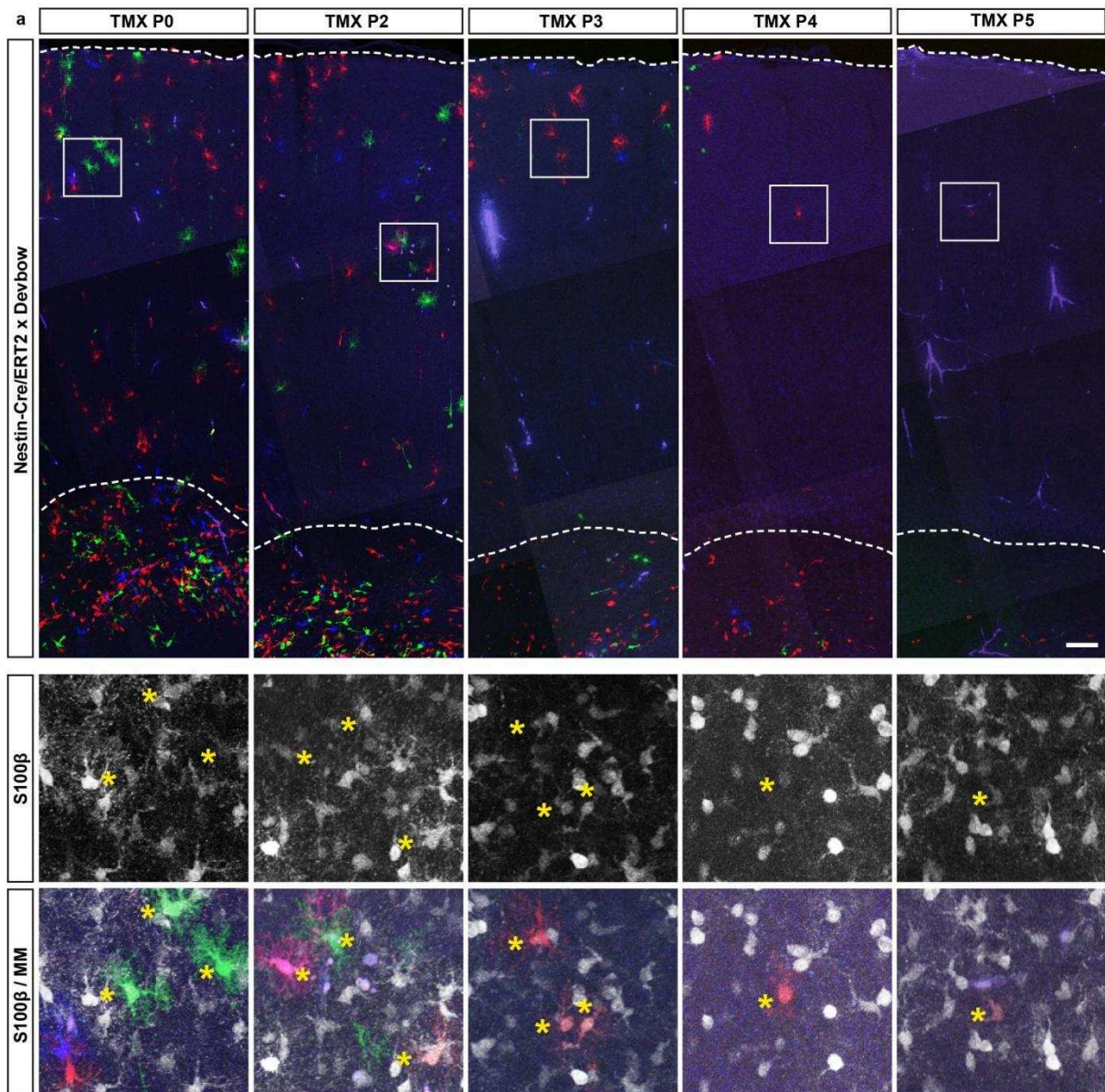


Figure 52. Contribution of postnatal Nestin+ cells to the astrocyte network.

(a) Single tamoxifen injections from P0 to P5 *C57BL/6-Tg(Nes-cre/ERT2)KEisc/J* (hereinafter referred to as Nestin-Cre/ERT2); *Devbow* pups results in cortical astrocyte labeling at P7. (b) The number of astrocyte-like cells per mm³ (containing both pial and protoplasmic subtypes) analyzed at P7 decreases drastically between P0 and P5 tamoxifen injections.

Maximal projections over 80 μm -thick sections. Scale bar: 60 μm

Ai9(RCL-tdT) ; *C57BL/6-Tg(Nes-cre/ERT2)KEisc/J*) avec l'injection d'une forte dose de tamoxifène à P0 pour déclencher la recombinaison dans les cellules Nestin+ et marquer ainsi en rouge les cellules Nestin+ et leur descendance générées après la naissance (contribution post-natale). On obtient avec ce protocole des cellules marquées de trois manières distinctes: YFP+/Tomato+ (représentées en orange, correspondant à la contribution postnatale, à partir des progéniteurs électroporés) ; YFP+/Tomato- (en vert, correspondant à la contribution prénatale seulement) ; et YFP-/Tomato+ (en rouge, correspondant à des cellules issues à des stades post-nataux de progéniteurs non électroporés à E15, non-analysées ici). Le ratio entre cellules oranges (YFP+/Tomato+) et cellules vertes (YFP+/Tomato-) donne ainsi une indication des descendance pré et post-natales au sein d'un même animal (Figure 53a). Cependant, certaines cellules vertes (YFP+/Tomato-) peuvent aussi provenir d'une recombinaison incomplète de l'allèle *RosaSTOPtdTomato* par le protocole d'injection de tamoxifène utilisé, et conduire à sous estimer la contribution prénatale. Pour évaluer cet effet, le taux de recombinaison (nombre de cellules YFP+/Tomato+ divisé par le nombre total de cellules YFP+) a été mesuré dans le RMS (zone contrôle) (Figure 53b-c) Il s'élève à 75% au plus proche de la zone sous ventriculaire (où se trouvent les cellules récemment générées), pour diminuer progressivement vers le bulbe olfactif (où ont migré les cellules générées plus précocement) : une majorité des cellules ciblées par l'électroporation semblent donc bien capables de recombiner à P0.

Les résultats obtenus grâce à la stratégie ci-dessus suggèrent que les progéniteurs corticaux embryonnaires et postnataux produisent de manière équivalente environ 45% d'astrocytes de type protoplasmique et 10% d'astrocytes de type pial (Figure 53d-e). Les couches II/III n'ont pas été analysées car elles présentent un marquage neuronal dense empêchant une identification morphologique fiable. L'analyse du positionnement des astrocytes de type protoplasmique YFP+/Tomato+ et YFP+/Tomato- dans le parenchyme cortical montre que les cellules générées après la naissance se situent préférentiellement dans les couches supérieures du cortex cérébral, et plus proches de la surface piale que celles produites par les progéniteurs embryonnaires (Figure 53f-g). L'ensemble de ces résultats appuie l'idée d'une double contribution des progéniteurs

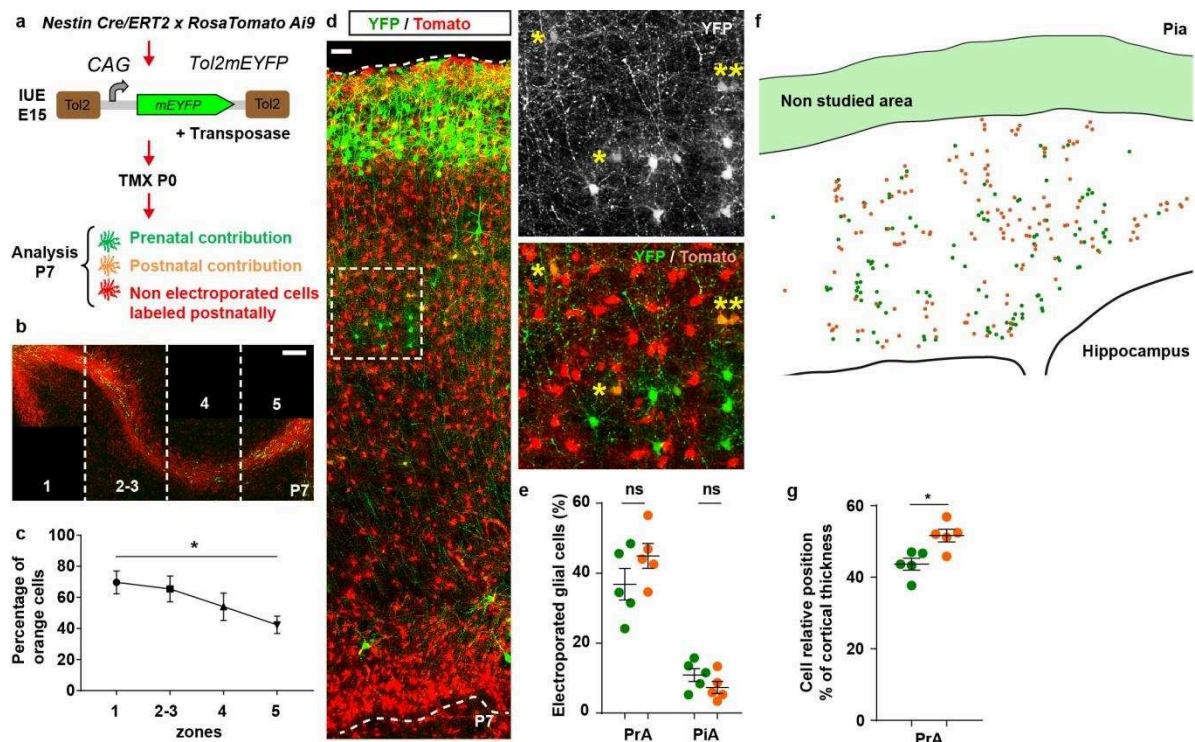


Figure 53. Dual contribution of embryonic and Nestin+ postnatal progenitors to the generation of cortical astrocytes.

(a) Experimental paradigm to analyze in the same animals at P7 the proportions of cortical astrocytes derived from embryonic delaminated progenitors (Tol2mEYFP⁺: prenatal contribution in green labeled through IUE of Tol2CAGmEYFP plasmids in E15 cortical progenitors) and from Nestin⁺ postnatally labeled cells (Tomato⁺ postnatal contribution in red labeled through tamoxifen injection at P0). Apical cortical progenitors that transition to the postnatal SEZ and then express Nestin are Tol2CAGmEYFP⁺/Tomato⁺ (orange). (b-c) Analysis performed in the Rostral Migratory Stream (RMS) gives a recombination rate from 75% nearby the SEZ to 50% in the vicinity of the olfactory bulb. (d) IUE of Tol2CAGmEYFP plasmid in E15 cortical progenitors followed by tamoxifen injection at P0 in *Nestin-Cre/ERT2;Ai9* mice results in the labeling of cortical astrocytes with Tol2CAGmEYFP⁺ cells (green) and Tol2CAGmEYFP⁺/Tomato⁺ (orange) issued from delaminated embryonic and postnatal progenitors respectively. (e) Proportions of Tol2mEYFP⁺ and Tol2CAGmEYFP⁺/Tomato⁺ astrocytes per animal show that both embryonic and postnatal progenitors produce around 45% of protoplasmic astrocytes (PrA) and 10% of pial astrocytes (PiA). (f) Schematic map pointing out the location of Tol2CAGmEYFP⁺ and Tol2CAGmEYFP⁺/Tomato⁺ astrocytes. Astrocytes located in the densely labeled neuronal layers 2/3 were excluded from analyzes as the high neural cell density prevented proper cell identification based on morphology. (g) Mean relative position of Tol2CAGmEYFP⁺ and Tol2CAGmEYFP⁺/Tomato⁺ astrocytes per animal (where 100% corresponds to pial surface) shows that postnatal progenitors produce PrA which are located higher in the cortical parenchyma than PrA produced by embryonic progenitors.

Maximal projections over 80 μ m-thick sections. Means \pm s.e.m. Scale bars (b) 160 μ m; (d) 50 μ m.

embryonnaires et postnataux à l'élaboration du réseau astroglial, mais qui ne semble pas être à l'origine de la diversité clonale précédemment observée.

En conclusion, les travaux présentés dans cette seconde partie ont permis de montrer que le facteur de transcription Olig2 est un marqueur précoce d'astrocytes corticaux impliqué dans le lignage de la majeure partie (et potentiellement la totalité) des astrocytes issus des progéniteurs situés dans la zone ventriculaire dorsale. Cependant il semble que l'expression d'Olig2 ne soit pas à l'origine de la variabilité observée à l'échelle clonale au sein du réseau astrocytaire. D'autre part, ces travaux démontrent l'existence d'une double contribution embryonnaire et postnatale des progéniteurs corticaux au réseau astroglial, dans des proportions qui restent encore à déterminer. Jusqu'à présent, le modèle de développement astrocytaire accepté par la communauté scientifique consistait en une première phase de colonisation du cortex cérébral par les cellules de la glie radiaire elles-mêmes ou leur descendance pendant la période prénatale, suivie d'une phase de prolifération locale massive postnatale. Les deux premières parties de ce travail de thèse, qui ont feront l'objet de la publication principale de ces travaux de thèse (Clavreul et al., en préparation, en annexe), permettent d'établir un nouveau modèle comprenant une double contribution embryonnaire et postnatale des progéniteurs corticaux de la zone ventriculaire, puis sous ventriculaire (Figure 54). Durant la première semaine postnatale les astrocytes générés par les progéniteurs pré et postnataux vont proliférer activement et de manière plus importante dans les couches supérieures du cortex cérébral, pour finir par remplir l'espace cortical, avec une densification du réseau. Cette phase dynamique est suivie par une phase de maturation à l'échelle cellulaire avec l'augmentation du volume des astrocytes et de la complexité de leurs arborisations.

Les résultats obtenus au cours de ces travaux suggèrent que les astrocytes corticaux présentent au cours du développement une importante plasticité, jusqu'à présent peu caractérisée (morphologie, dispersion, localisation). Cela pose à présent la question des mécanismes de régulation intervenant dans le contrôle de cette plasticité. Pour aborder cette question, je me suis intéressée à l'étude de certains des acteurs moléculaires régulant la prolifération et la migration des astrocytes dans le cortex cérébral murin.

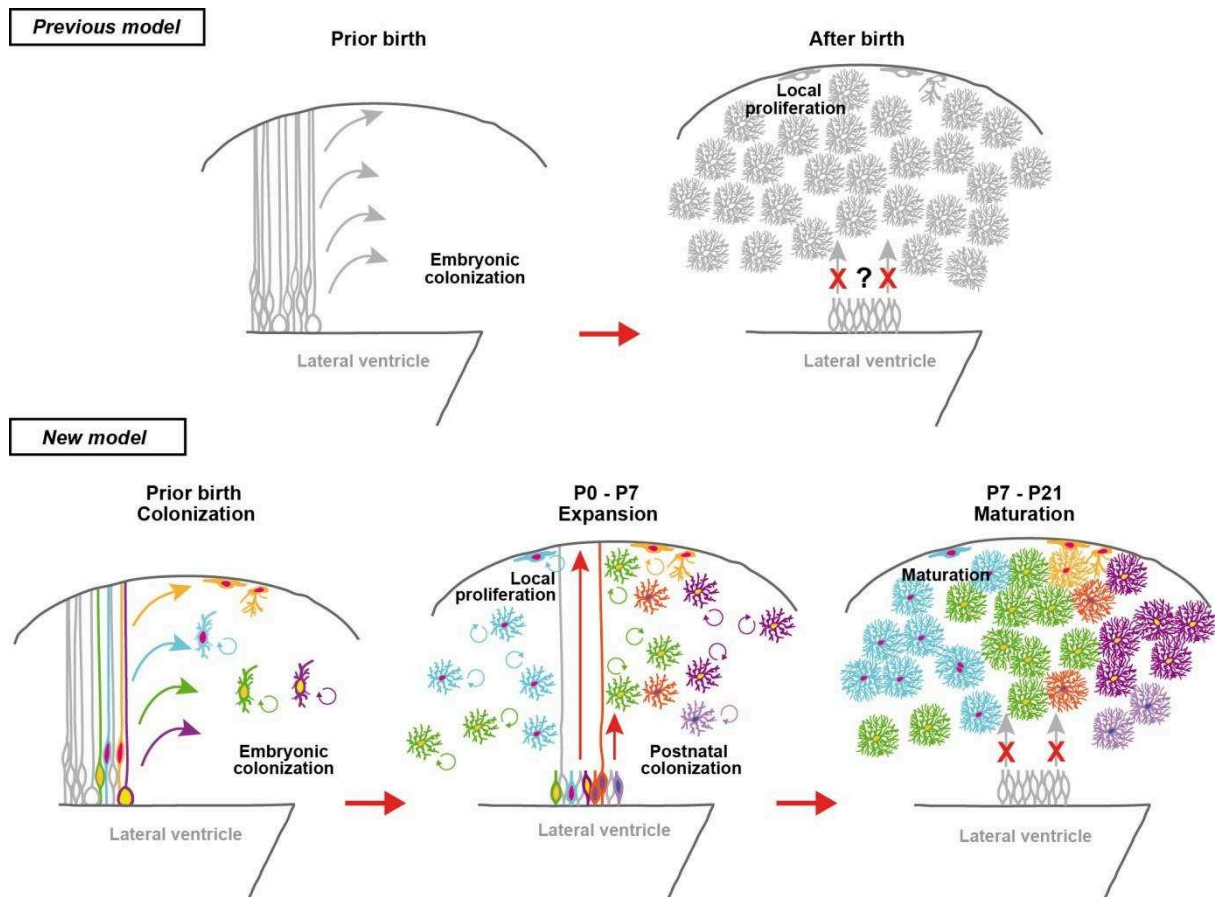


Figure 54. A new model for astrocyte development in the mouse cerebral cortex.

Until now the accepted model of mouse cortical astrocyte development consisted in a first phase where embryonic progenitors colonize the neocortical wall followed by a second phase relying heavily on local proliferation of these first progenitor settlers after birth, postnatal contribution of SEZ progenitors being still debated. Here we propose that mouse cortical astrocytes are issued from a dual contribution of delaminated embryonic apical progenitors and postnatal Nestin⁺ progenitors. Furthermore our data show that during the first postnatal week (P4-P7) both pre- and postnatal progenitors scatter throughout the neocortical wall while proliferating actively and filling up the space inside clonal boundaries (inward clonal expansion). This dynamic phase is followed by a maturation phase (P7-P21) where the clones stop both expansion and proliferation while individual astrocytes increase their volume and processes complexity.

PARTIE 3 : Exploration des mécanismes de régulation du développement du réseau astrocytaire

Quels sont les mécanismes régulant la mise en place du réseau astrocytaire décrite dans les deux premières parties de ces travaux ? L'organisation clonale dispersée que nous avons observée implique-elle une migration active des astrocytes pendant le développement ? Si la migration radiale et tangentielle des neurones au cours de la formation du cortex cérébral est globalement bien connue (voir le paragraphe 3.3 de l'introduction), ce n'est pas encore le cas des mouvements des astrocytes. La stratégie MAGIC Markers utilisée dans l'équipe est idéale pour étudier les effets cellulaire-autonomes et non cellulaire-autonomes de molécules candidates via une perturbation expérimentale associée à une couleur spécifique. L'équipe a validé cette stratégie en associant la forme dominante négative de LGN (G protein signaling modulator, protéine impliquée dans la régulation de l'orientation du fuseau mitotique) à une des protéines fluorescentes (mCerulean) exprimées par le transgène intégratif *T2Cytbow* (Loulier et al., 2014). Les animaux électroporés avec ce plasmide à E14 présentaient trois jours plus tard (E17) un nombre réduit de cellules exprimant dnLGN, marquées avec mCerulean, au niveau de la zone ventriculaire, par rapport aux cellules contrôles, marquées avec tdTomato et eYFP ; à l'inverse, un nombre élevé de cellules exprimant dnLGN était retrouvé au niveau de plaque corticale supérieure, comparé aux cellules contrôles. Ces résultats confirment le phénotype observé précédemment chez la souris LGN KO (Konno et al., 2008) qui montre l'importance de l'orientation du fuseau mitotique dans la production de la glie radiaire externe ou apicale, les divisions obliques de la glie radiaires provoquées par la perturbation induisant un renouvellement des progéniteurs en dehors de la zone germinale (Shitamukai et al., 2011). Des molécules candidates impliquées dans la prolifération, la différenciation ou la migration des astrocytes peuvent donc être étudiés grâce à cette stratégie mosaïque.

1. Perturbation mosaïque de l'organisation corticale par l'éphrine B1 intégrée aux MAGIC Markers

Des travaux publiés par le groupe de P. Vanderhaegren montrent l'effet cellulaire-autonome de l'éphrine B1 dans l'agrégation des neurones pyramidaux.

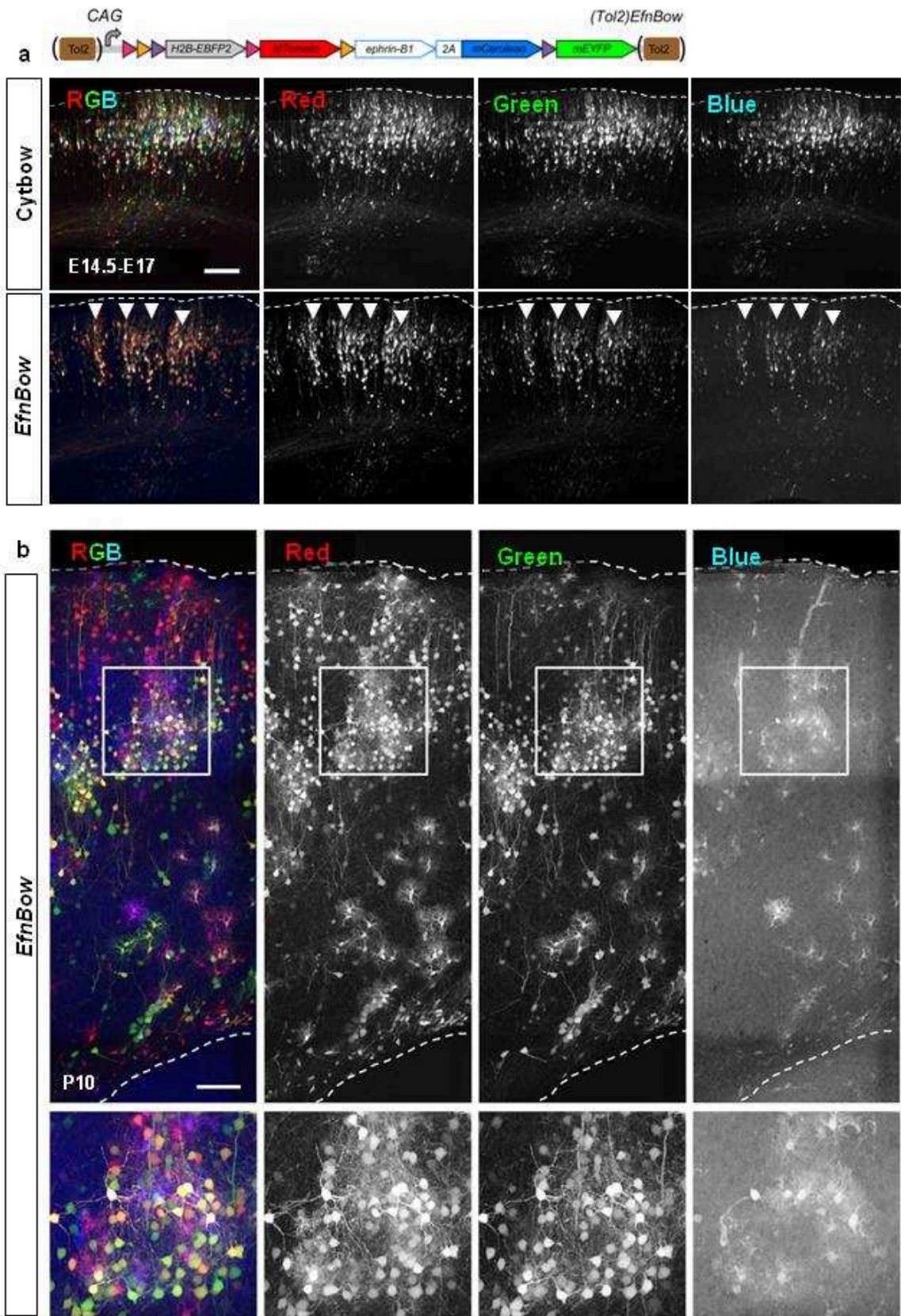
Cette molécule d'adhésion contrôle la distribution des neurones pyramidaux en restreignant leur migration tangentielle (Dimidschstein et al., 2013). L'éphrine B1 est également exprimée par les astrocytes dans plusieurs régions du système nerveux central chez la souris et chez l'Homme (Schmidt et al., 2007; Nikolakopoulou et al., 2016), faisant de cette molécule un acteur potentiel de la régulation de la migration astrocytaire corticale.

Pour comprendre le rôle de la voie Eph/éphrine dans la corticogenèse, une étude en collaboration avec Alice Davy (CBD, Toulouse) a été entamée. L'impact d'une suractivation de la signalisation éphrine B1 a tout d'abord été étudié. Pour disséquer les effets cellulaire-autonomes de cette perturbation (action directe sur les cellules perturbées) et non cellulaire-autonomes (effet indirect sur les cellules voisines), la stratégie de perturbation moléculaire mosaïque décrite ci-dessus a été exploitée. Nous avons modifié le transgène *T2Cytbow* pour faire co-exprimer une forme constitutivement active de l'éphrine B1 en association avec le marqueur bleu (mCerulean) (Figure 55a). Electroporée dans le cortex embryonnaire, cette construction *EfnBow* induit une agglomération (clustering) des neurones exprimant la perturbation (cellules bleues), mais aussi des cellules voisines (rouges et vertes) n'exprimant pas cette perturbation, visible à E17 (Figure 55a). Ces résultats corroborent les résultats précédemment publiés (Dimidschstein et al., 2013) et mettent en évidence un potentiel effet non cellulaire-autonome de l'éphrine B1 lors du développement de la cytoarchitecture corticale. Outre les neurones, l'analyse des stades postnataux (P10) révèle également une agrégation anormale des astrocytes après perturbation (Figure 55b), malgré une absence de désorganisation visible du cortex cérébral, visualisée avec le marqueur nucléaire ToPro3 (données non présentées). Cependant la couleur bleue étant associé à la perturbation, il est difficile

Figure 55. Long term disruption of cortical organization with EphrinB1.

(a) *T2Cytbow* transgene modification including the constitutively active form of EphrinB1 is upstream of the cyan fluorescent protein (*Efnbow*). Coronal sections of mouse cortical neuroepithelium electroporated at E14,5 and analyzed at E17 in control situation (*T2Cytbow*) and with *Efnbow* where neuronal clusters (arrowheads) were observed (images: K. Loulier). (b) IUE of *EfnBow* in cortical progenitors at E13 shows a phenotype of hypercluserisation of cortical cells at P10, including astrocytes.

Dotted lines: pial surface and ventricular zone. Scale bars: 100 μ m.



(légende sur la page précédente)

d'effectuer des analyses clonales fiables tout en contrôlant le degré de perturbation. De plus, la perturbation étant intégrée au génome des progéniteurs, cette stratégie ne permet pas de savoir si le phénotype observé est dû à une perturbation des astrocytes eux-mêmes ou à la perturbation des neurones avec lesquels ils interagissent. Pour répondre à cette interrogation, une stratégie de perturbation dissociée du marquage multicolore a été élaborée.

2. Perturbation mosaïque de l'organisation corticale par l'éphrine B1 dissociée des MAGIC Markers

Pour mieux caractériser le rôle de la signalisation éphrine B1 dans la régulation de l'astroglionèse, nous avons mis en place une stratégie permettant l'analyse clonale avec les MAGIC Markers conjointement avec la surexpression de l'éphrine B1 associée à une 4ème couleur. Pour cela, un transgène coexprimant la forme constitutivement active de l'éphrine B1 et l'iRFP 670 (Shcherbakova and Verkhusha, 2013) sous contrôle du promoteur CAG a été construit (*Cag-EfnB1-iRFP*) (Figure 56a). Ce travail a en partie été réalisé par Emeline Cuoc, en stage de Master au laboratoire, sous ma supervision. Cette approche non intégrative permet de doser l'intensité d'une perturbation transitoire tout en analysant ses effets non autonome-cellulaires. Les constructions perturbant la signalisation éphrine B1 ont été électroporées dans les progéniteurs corticaux *in utero* ciblant ainsi les neurones générés à E13 sans perturber le réseau neuronal déjà présent ni les cellules générées plus tardivement. Les résultats montrent qu'aux stades E17 et P7, le phénotype de regroupement neuronal observé avec la construction précédente est retrouvé et semble restreint aux cellules nées au temps de l'électroporation (couches III/IV) (Figure 56b). Cependant, à tous les stades observés, la protéine rapportrice de la perturbation (iRFP) n'a pu être détectée.

3. Analyse de la perturbation par l'éphrine B1 *in vitro*

Pour comprendre la raison de l'absence de détection de la protéine rapportrice, des tests *in vitro* ont été effectués afin de rechercher un éventuel problème d'expression de l'iRFP ou une toxicité de la construction. Un plasmide

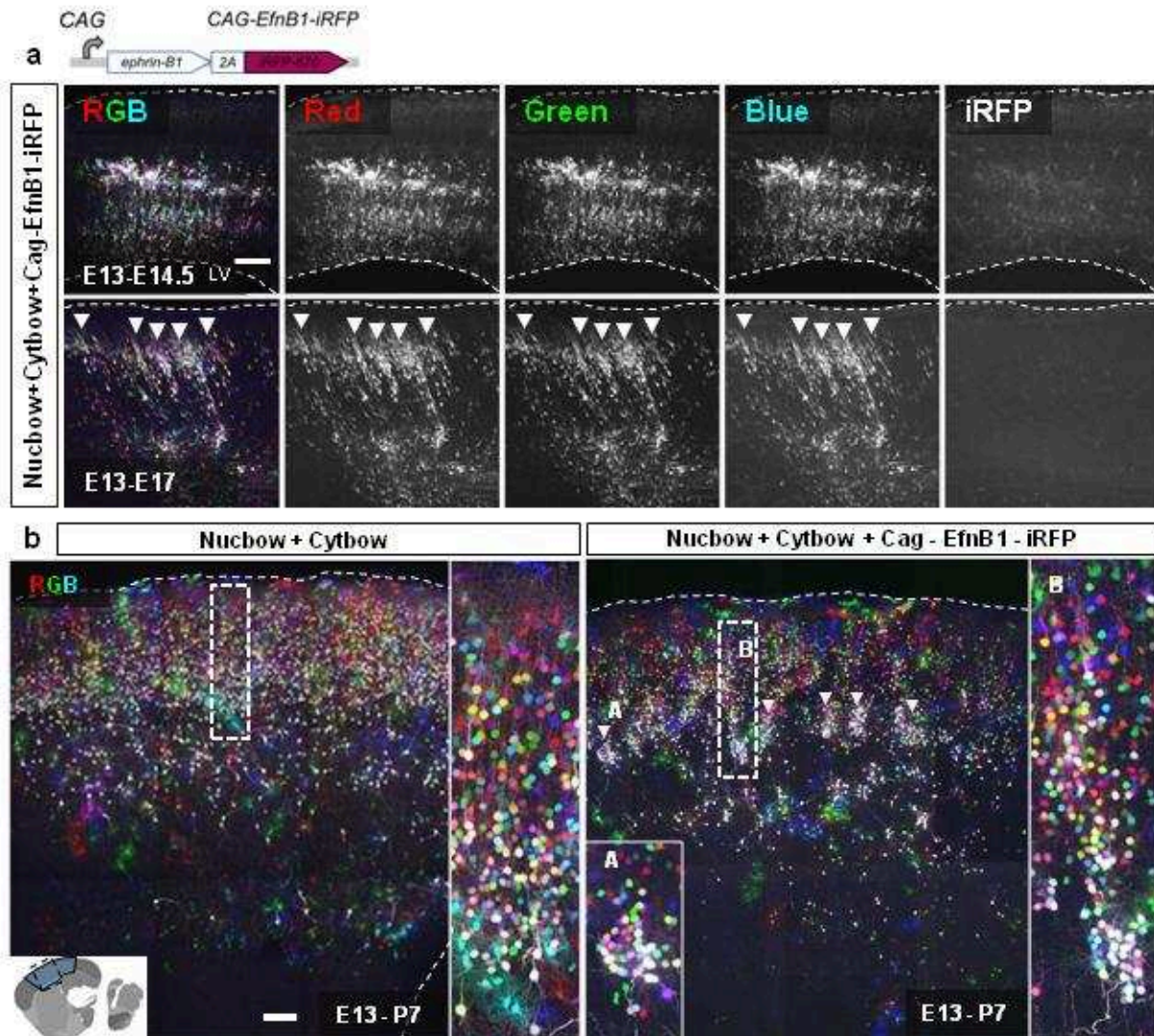


Figure 56. Short term disruption of local cortical organization with EphrinB1.

(a) Coronal sections of mouse cortical neuroepithelium electroporated at E13 and analyzed at E14.5 (*top*) and E17.5 (*bottom*). iRFP was not detected in both conditions. Neurons were organized in clusters at E17.5 (*top*; *arrowheads*). (b) Sagittal sections of mouse cerebral cortex electroporated at E13 and analyzed at P7. Labeled neurons are organized in clusters at P7 (*right*; *arrows*) in comparison to the homogeneous lateral dispersion of neurons in the control animals (*left*). *A-B*: close ups. Neurons located in superior layers appear properly organized (*B*).

Dotted lines: pial surface and ventricular zone. *LV*: lateral ventricle. *Scale bars*: (a) 100 μm , (b) 300 μm .

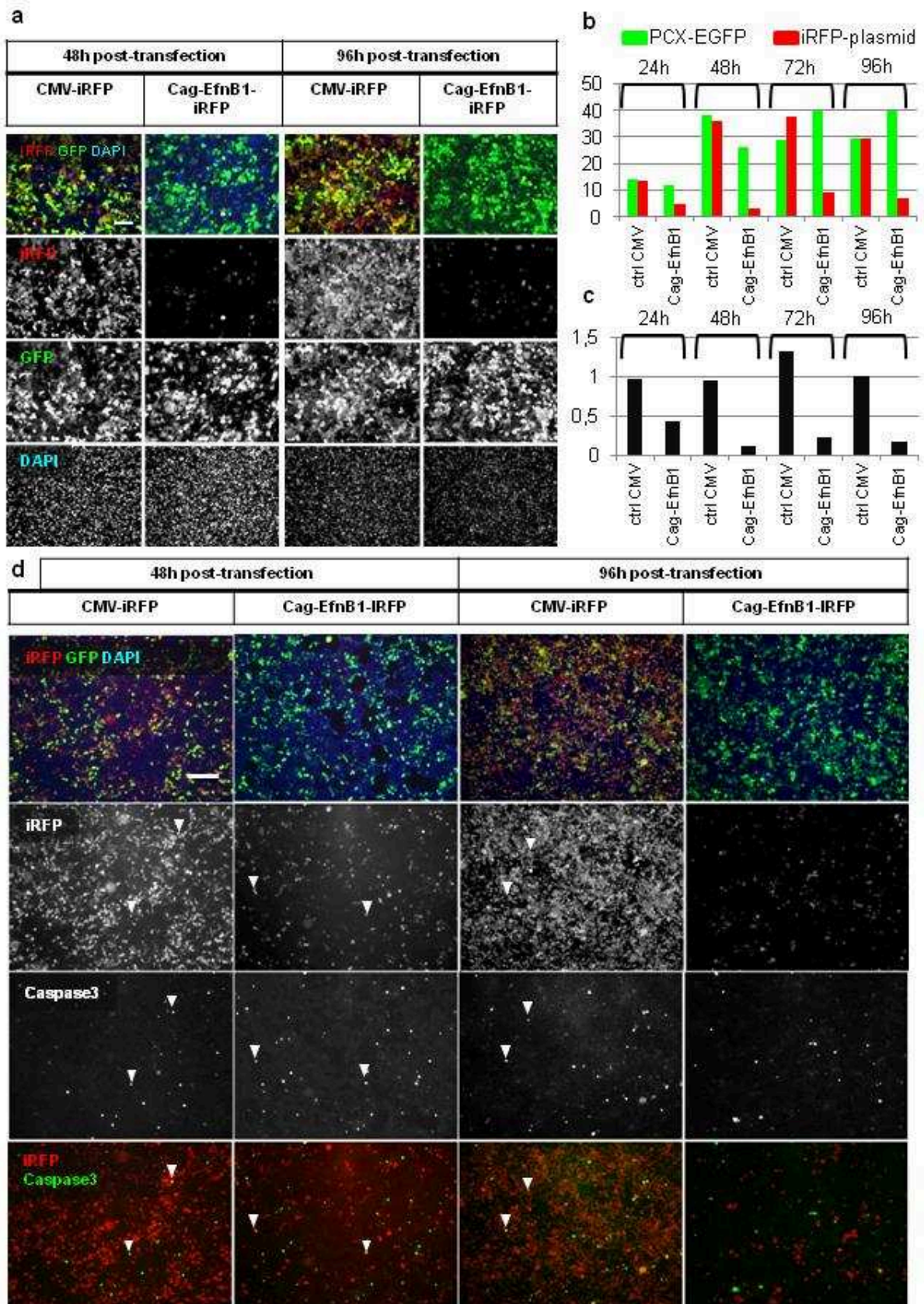
contrôle exprimant l'iRFP 670 sous contrôle d'un promoteur CMV a été transfecté dans des cellules HEK. L'iRFP est détectée correctement en conditions contrôles, excluant un problème de production ou de détection de cette protéine fluorescente. Au contraire, le plasmide *Cag-EfnB1-iRFP* est très faiblement exprimé *in vitro* (Figure 57a-b), de même qu'*in vivo* (Figure 56a, données non présentées) en particulier à partir de 48h après la transfection (Figure 57b-c). Pour détecter l'apoptose, un marquage immunohistochimique anti-Caspase 3a a été effectué, ne montrant aucune différence apparente entre les conditions contrôles et perturbées. Des quantifications supplémentaires sont nécessaires pour conclure sur ce point. L'analyse des effets de la perturbation sur le réseau astroglial est pour l'instant suspendue à la résolution du problème de l'expression de la protéine rapportrice iRFP.

Au cours de cette troisième et dernière partie, l'étude du rôle de la signalisation Eph/éphrine dans la prolifération et la migration des astrocytes a été entamée. Si l'approche innovante de perturbation génétique mosaïque utilisée a permis d'obtenir des résultats préliminaires semblant indiquer que l'éphrine B1 peut jouer un rôle dans l'espacement régulier des astrocytes dans le parenchyme cortical et l'agencement des frontières des domaines formés par leurs prolongements, des expériences complémentaires pouvant impliquer la modification de la construction sont nécessaires afin de pouvoir visualiser les cellules perturbées.

Figure 57. Expression and toxicity tests *in vitro* of Cag-EfnB1-iRFP.

(a) HEK cells were transfected with PCX-EGFP and CMV-iRFP (control) or with Cag-EfnB1-iRFP. Cells were analyzed 1,2,3 and 4 days post-transfection. (*24h and 72h post-transfection: data not shown*) (b) Estimation of the percentage of PCX-EGFP and iRFP-plasmids (CMV-iRFP or Cag-EfnB1-iRFP) transfected cells at 48h and 96h post-transfection. The percentage of cells expressing iRFP is lower than in control. (c) Ratio of the percentage of iRFP-plasmids (CMV-iRFP or Cag-EfnB1-iRFP) transfected cells in comparison to the percentage of PCX-EGFP transfected cells. The ratio in Cag-EfnB1 condition is lower than in control. (d) Apoptosis was investigated by using immunohistochemistry against Caspase-3. The number of cells co-expressing iRFP and Caspase3 (*arrowheads*) does not seem different between control and Cag-EfnB1 conditions.

Scale bars: 100 μ m



(légende sur la page précédente)

Conclusion

Au cours mon travail de doctorat, j'ai cherché à caractériser la contribution individuelle des progéniteurs corticaux à la construction du réseau astroglial cortical, avec notamment l'étude de la composition des clones d'astrocytes qu'ils génèrent, leur dynamique de prolifération et leur maturation pendant le développement postnatal. L'approche que j'ai utilisée a consisté à marquer précocement des progéniteurs corticaux chez la souris avec des marqueurs multicolores afin d'identifier les astrocytes qui en sont issus au cours du développement. Grâce à l'implémentation de nouvelles approches pour imager les échantillons en grand volume en collaboration avec l'équipe d'Emmanuel Beaurepaire (Abdeladim et al., en révision) et en combinant ces méthodologies innovantes d'imagerie avec l'analyse multi-clonale, une étude exhaustive du développement du réseau astroglial dans le cortex cérébral a été effectuée. Plusieurs aspects clefs de la formation du réseau astroglial ont ainsi été mis en évidence (Clavreul et al., en préparation).

Les résultats indiquent que les progéniteurs corticaux génèrent des clones hétérogènes en termes de composition (taille, sous-types d'astrocytes), de positionnement et de dispersion, qui s'inter-mêlent avec leurs voisins au cours d'une phase dynamique de prolifération et de dispersion pendant la première semaine postnatale, aboutissant à une densification du réseau astroglial, puis d'une phase de maturation morphologique à l'échelle cellulaire (collaboration avec Gilles Bonvento, MIRCEN, Cea). Ni le facteur de transcription Olig2, clairement identifié au cours de ces travaux comme marqueur précoce du lignage astrocytaire cortical, ni la double contribution embryonnaire et postnatale des progéniteurs corticaux au réseau astroglial ne semblent être à l'origine de l'hétérogénéité clonale des astrocytes. Malgré leur morphologie complexe, les astrocytes corticaux présentent au cours du développement une importante plasticité jusque-là méconnue, ce qui pose la question des mécanismes susceptibles de la contrôler qui ont fait l'objet de travaux recherches préliminaires, avec notamment l'étude du rôle de l'éphrine B1 dans le positionnement des astrocytes dans le cortex cérébral murin. La poursuite de ces travaux permettra de mieux comprendre comment les astrocytes se positionnent et acquièrent leurs caractéristiques morphologiques au cours du développement du cortex cérébral, et de préciser la nature de leurs interactions avec leur environnement neuronal.

Discussion & Perspectives

Depuis les trente dernières années, les études des cellules gliales se sont intensifiées et le développement ainsi que l'hétérogénéité des astrocytes sont aujourd'hui des sujets très suivis dans le domaine des neurosciences. Rien qu'au cours de ces travaux de thèse, de nombreux articles en lien avec ces thématiques ont été publiés à travers le monde, dont cinq directement liées à certains aspects clefs de ce projet de thèse et qui seront abordés dans cette discussion: l'hétérogénéité, le développement, les origines, la prolifération et la morphologie des astrocytes corticaux (Beattie et al., 2017; Stogsdill et al., 2017; Lanjakornsiripan et al., 2018; Tatsumi et al., 2018; Moroni et al., 2018), sans compter les nombreuses revues sur le sujet (Bayraktar et al., 2015; Khakh and Sofroniew, 2015; Molofsky and Deneen, 2015; Schitine et al., 2015; Tabata, 2015; Ben Haim and Rowitch, 2017).

Contrairement aux autres stratégies multicolores (Zong et al., 2005; García-Marqués and López-Mascaraque, 2013; Garcia-Moreno et al., 2014), notre stratégie MAGIC Markers permet de marquer efficacement et d'analyser un très grand nombre de clones sur un nombre d'échantillons réduit, jusqu'à 160 clones par animal, avec des marqueurs stables et identifiables par des critères de combinaisons de couleurs, d'apparence finale et de continuité définis grâce aux mesures de ces différents paramètres réalisées sur clones uniques. L'analyse de la distribution spatiale et de la morphologie des marqueurs combinatoires complexes exprimés par les progéniteurs corticaux et leur descendance astrocytaire a permis de mettre en évidence une grande variabilité entre populations clonales en termes de nombre et de sous-types cellulaires générés mais aussi à l'échelle des cellules elles-mêmes.

1. Hétérogénéité des progéniteurs corticaux

Les analyses clonales des astrocytes corticaux nous donnent des informations sur leurs progéniteurs. La variabilité observée en termes de nombre et sous-types d'astrocytes générés et de leur organisation est-elle d'origine intrinsèque avec des progéniteurs hétérogènes en termes d'expression génique, d'origine développementale et de type de descendance ou bien d'origine extrinsèque avec des progéniteurs homogènes qui répondent à des signaux environnants influençant leurs potentialités et donc leur comportement ?

1.1. Nombre de cellules générées par les progéniteurs corticaux

Nos résultats montrent que les progéniteurs corticaux ciblés entre E13 et E15 génèrent 8 à 10 cellules en moyenne, avec une grande variabilité (entre 1 et 42 cellules) qui ne peut pas uniquement être expliquée par leur localisation finale dans le parenchyme cortical où les clones sont de plus grande taille à proximité de la surface piaie puisque le rapport taille/position n'est pas linéaire de la zone ventriculaire à la surface piaie. Les mécanismes de régulation de la génération du nombre d'astrocytes restent encore à découvrir. Au cours de la neurogenèse corticale, les cellules de la glie radiaire pourraient se diviser un nombre de fois défini intrinsèquement, comme cela semble être le cas pour la génération des cellules granulaires cérébelleuses (Espinosa and Luo, 2008), produire un nombre de neurones prédictible (Gao et al., 2014), avec des sorties de cycle pour un nombre de cellules (quiescentes) définies au cours de la neurogenèse et dont le nombre de divisions successives entre E11 et E17 (11 chez la souris d'après des analyses de durée du cycle cellulaire et du nombre de cellules en prolifération au cours du développement) (Takahashi et al., 1995) permettent de modéliser la croissance du cortex (Takahashi et al., 1996). On pourrait imaginer que les cellules de la glie radiaire puissent faire de même au cours de l'astrogliogenèse, avec un nombre défini de divisions cellulaires et une régulation de sortie de cycle sous un contrôle temporel et séquentiel exercé par des facteurs de transcription comme c'est le cas pour les neurones chez la drosophile (Bayraktar and Doe, 2013; Li et al., 2013), facteurs qui restent encore à déterminer.

Un régulateur clef du mode de division cellulaire (symétrique ou asymétrique, neurogénique ou gliogénique) des cellules de glie radiaire a été identifié récemment : Lgl1 (lethal giant larvae homolog 1, protéine régulatrice de la polarité intracellulaire (Betschinger et al., 2003; Yamanaka et al., 2003). La perturbation de la fonction embryonnaire de Lgl1 affecte l'intégrité du neuroépithélium et l'établissement des zones ventriculaire et sous ventriculaire avec un phénotype d'hétérotopie laminaire sous-corticale, et aboutit, d'une manière autonome cellulaire, à une augmentation massive du nombre de cellules en prolifération dans la plaque corticale de E17 à P7 et du nombre d'astrocytes générés par des progéniteurs individuels sans que l'on sache si le nombre de progéniteurs gliogéniques (1/6 (Gao et al., 2014)) est augmenté (Beattie and Hippenmeyer, 2017; Beattie et al., 2017). Approfondir les

connaissances des mécanismes gliogéniques prolifératifs permettrait de mieux comprendre la part de l'expansion du cortex au cours de l'évolution associée spécifiquement à la production de cellules gliales par des progéniteurs intermédiaires aux capacités prolifératives améliorées comme ce qui a été démontré pour les neurones dont la production est accrue dans la zone sous ventriculaire externe chez le primate (Dehay et al., 2015). En particulier, il serait intéressant de caractériser le nombre de progéniteurs corticaux gliogéniques chez les différentes espèces et son lien avec l'expansion corticale de l'espèce associée. Grâce à nos analyses clonales, nous connaissons le nombre d'astrocytes produits (= nombre d'astrocytes MAGIC Markers+) par un nombre défini de progéniteurs corticaux (= nombre de clones astrocytaires MAGIC Markers+ distincts) dans un volume précis et avec des analyses de densité réalisées avec un marqueur astrocytaire tel que S100 β ou Aldh1L1 à des stades matures, il devrait être possible d'estimer le nombre de progéniteurs initiaux à l'origine de ce volume cortical précis sans qu'une potentielle prolifération (et/ou apoptose) différentielle dans le temps et l'espace ou les origines multiples des progéniteurs n'en biaise le résultat.

Nos résultats confirmant que la prolifération locale est une source importante d'astrocytes corticaux (Ge et al., 2012), nous ne sommes cependant pas en mesure d'établir que la production astrocytaire suive un programme aussi déterminé que celui observé pour les neurones pyramidaux à partir des cellules de glie radiaire (Gao et al., 2014), et des composantes stochastiques à l'échelle des progéniteurs individuels pourraient jouer un rôle dans cette production (stade du début de la phase gliogénique, sortie de cycle), expliquant la variabilité que nous avons observée à l'échelle clonale en termes de nombre de cellules produites. La production astrocytaire pourrait être contrôlée par des signaux homéostatiques via des interactions cellule-cellule entre astrocytes pour assurer une couverture complète du parenchyme cortical (Molofsky and Deneen, 2015). Une fois la couverture complète et les domaines astrocytaires établis, la prolifération s'arrêterait. Nos résultats montrent une production d'astrocytes par les progéniteurs situés au niveau du ventricule dorsal à des stades embryonnaires puis postnataux. Le nombre de cellules par clone pourrait donc dépendre du moment d'arrivée (possiblement variable selon l'origine embryonnaire ou postnatale du progéniteur) du premier astrocyte dans le parenchyme cortical et du nombre de divisions qu'il aurait le temps de réaliser avant

que l'espace ne vienne à manquer. Cette hypothèse est appuyée par nos résultats montrant que le volume clonal n'augmente plus après la phase proliférative et que l'écartement de deux cellules sœurs est moindre à P7 qu'à P4, traduisant une stabilisation du réseau, responsable notamment de la présence de doublets d'astrocytes même en l'absence de prolifération.

D'autres hypothèses pourraient expliquer la variabilité de la taille des clones astrocytes : l'existence de mécanismes de compétition et/ou apoptotiques. La mort cellulaire programmée accompagne le développement de nombreux tissus, y compris le système nerveux central où un certain nombre de neurones sont éliminés une fois les contacts synaptiques établis avec leurs cibles (Dekkers and Barde, 2013) sans que l'on sache si cela peut s'appliquer au développement astrocytaire cortical. Des données préliminaires obtenues à partir d'immunomarquages anti Caspase-3a (marqueur apoptotique) réalisés sur des échantillons MAGIC Markers+ à P7 ne montrent pas d'astrocytes engagés dans un processus de mort cellulaire (données non présentées), cependant, nos résultats indiquent aussi que le nombre de cellules par clone est déjà stable à ce stade, laissant supposer que si des événements apoptotiques interviennent au cours de la gliogenèse (encore non documentés), ils se produiraient selon toute vraisemblance avant la fin de la première semaine postnatale.

Que se passe-t-il une fois que le réseau astrocytaire est stabilisé ? Nos résultats et ceux d'autres groupes montrent un arrêt complet de la prolifération astrocytaire dans le cortex cérébral au plus tard à P21 (Ge et al., 2012), cela veut-il dire que leur potentiel prolifératif est perdu ? Est-ce que tous les astrocytes peuvent être considérés comme des progéniteurs ? La prolifération astrocytaire reprend en situation d'astrogliose qui consiste en des changements moléculaires, cellulaires et fonctionnels des astrocytes en réponse aux pathologies et lésions du système nerveux central (Sofroniew, 2014). D'autre part les astrocytes agissent en tant que cellules souches neurales (cellules B1) au niveau de la zone sous ventriculaire adulte pour générer des neurones tout au long de la vie (Doetsch et al., 1999; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Bayraktar et al., 2015). Si les cellules souches neurales adultes expriment de nombreux marqueurs astrocytaires tels que GFAP (Doetsch et al., 1999), Glast (Mich et al., 2014) et Aldh1L1 (Foo and Dougherty, 2013), ces deux populations (astrocytes réactifs – cellules souches neurales) diffèrent par les types

cellulaires qu'elles génèrent et leurs expressions géniques respectives, et ce en fonction des zones cérébrales (Götz et al., 2015). Par ailleurs, les cellules souches neurales adultes ayant accès aux ventricules (Doetsch et al., 1999; Alvarez-Buylla and García-Verdugo, 2002), tout comme les cellules de la glie radiaire (qui perdent ce contact au cours de leur différenciation en astrocytes (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009)), le contact avec le ventricule pourrait être important pour véhiculer les signaux neurogéniques, et pourrait en partie être responsable des capacités prolifératives différentielles entre des populations astrocytaires distinctes. Une étude réalisée dans le striatum murin adulte montre par ailleurs que la capacité neurogénique des astrocytes serait conservée chez l'adulte (en dehors des cellules souches neurales des zones neurogéniques adultes) mais inhibée via la voie de signalisation Notch. Le blocage de la signalisation Notch, qui survient en cas d'accident vasculaire cérébral, entraîne les astrocytes dans un processus neurogénique (Magnusson et al 2014). Cependant, il reste à déterminer si ce mécanisme est également actif dans le cortex cérébral.

Il y a aujourd'hui un réel besoin d'identifier les populations astrocytaires prolifératives postnatales, ou ayant conservé cette capacité proliférative afin de pouvoir l'induire ou l'inhiber dans des contextes pathologiques spécifiques (avec des facteurs de transcription à déterminer par exemple). En effet si les bénéfices de l'astrogliose sont nombreux : réparation d'une lésion, préservation des fonctions neurologiques et protection des tissus contre les ischémies, infections, traumatismes, inflammations auto-immunes et la neurodégénération, il y a cependant des inconvénients dans certaines circonstances spécifiques: exacerbation de l'inflammation, diminution de l'excitotoxicité du glutamate, inhibition de la régénération axonale (Sofroniew, 2014), encourageant le développement de thérapies permettant la régulation de cette réaction. Un moyen de réduire la formation de la cicatrice gliale tout en remplaçant les neurones endommagés au niveau d'une zone lésée est la reprogrammation directe de la glie réactive de cette zone (Ninkovic and Götz, 2018). La reprogrammation consiste à transformer une cellule différenciée en cellule pluripotente pour lui faire générer des neurones par exemple, ou en une autre cellule différenciée (reprogrammation directe). Il est désormais possible de reprogrammer *in vivo* chez la souris i) des astrocytes en neuroblastes dans le striatum adulte en délivrant le facteur de transcription SOX2

(essentiel pour le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires) par injection virale de lentivirus sous promoteur hGFAP infectant les astrocytes résidents, et qui se différencieront en neurones matures, fonctionnels et intégrés au réseau neural local en présence de facteurs neurotrophiques (Niu et al., 2013) ; ii) des astrocytes GFAP+ en neurones par injection virale des gènes de conversion neurale achaete-scute complex-like 1 (Ascl1), brain-2 (Brn2a), et myelin transcription factor-like 1 (Myt1l) dans le striatum (Torper et al., 2013); iii) des astrocytes réactifs corticaux adultes directement en neurones glutamatergiques s'intégrant au réseau neural local par injection rétrovirale du facteur de transcription NeuroD1 (Guo et al., 2014). L'ensemble de ces études apporte des résultats prometteurs pour envisager la reprogrammation des astrocytes en neurones en tant que thérapie pour traiter des circuits neuronaux dysfonctionnels en particulier dans le cas des maladies neurodégénératives. Comme certaines sous-populations de cellules sont résistantes à la reprogrammation (Treutlein et al., 2016), il est nécessaire de mieux caractériser l'hétérogénéité des astrocytes adultes et leur origine développementale, d'identifier les populations prolifératives astrocytaires et peut être d'autres populations encore non caractérisées, et ce à l'échelle des différentes couches corticales via des études alliant séquençage d'ARN sur cellules uniques et souris transgéniques sous contrôle de promoteurs spécifiques des astrocytes.

L'ensemble de nos résultats ainsi que les mécanismes gliogéniques connus ne permettent pas à ce jour d'expliquer la variabilité constatée en termes de nombre d'astrocytes générés par les progéniteurs corticaux mais les sous-types d'astrocytes observés nous éclairent sur les potentialités de ces progéniteurs.

1.2. Sous-types astrocytaires et autres cellules générés par les progéniteurs corticaux

Quelle est la contribution des progéniteurs corticaux aux différents lignages cellulaires ? Bien que la majeure partie de mes travaux se soit focalisée sur les astrocytes et leurs différents sous-types protoplasmique et pial situés dans le parenchyme cortical, les méthodes que j'ai employées ont également apporté des éléments concernant d'autres types cellulaires présents dans le cortex cérébral.

Astrocytes protoplasmiques – Astrocytes piaux/fibreux

Contrairement aux résultats obtenus avec la méthode StarTrack (utilisant un promoteur GFAP) en faveur de l'existence de cellules progénitrices spécialisées pour un sous-type d'astrocytes (protoplasmique ou pial) avec 87.3% de clones homogènes à proximité de la surface piale (50.7% piaux et 36.6% protoplasmiques) (García-Marqués and López-Mascaraque, 2013), nos données utilisant le promoteur ubiquitaire CAG montrent clairement l'existence de progéniteurs corticaux bipotents, capables de générer les deux sous types d'astrocytes, avec plus de 80% des astrocytes de type pial appartenant à des clones hétérogènes dont les proportions en astrocytes protoplasmiques et piaux sont très variables d'un clone à l'autre. Nos observations de morphologies intermédiaires entre astrocytes de type protoplasmique et astrocytes de type pial ayant un phénotype de type fibroblaste d'un côté et un phénotype ramifié de l'autre au niveau de la surface piale sont en faveur de l'existence de progéniteurs bipotents. L'appartenance des cellules générées à un sous-type astrocytaire particulier pourrait être principalement liée à leur localisation dans le cortex cérébral. Cependant, cela ne permet pas d'affirmer que tous les progéniteurs ont strictement les mêmes potentialités. Nos résultats montrent que cette potentialité n'est pas modifiée entre les progéniteurs marqués au stade E13 et ceux marqués à E15, mais rien ne prouve que ce n'est pas le cas ultérieurement, puisque nos résultats montrent également que les progéniteurs postnataux continuent de générer des astrocytes de la surface piale. La présence de clones hétérogènes dans les couches supérieures du cortex cérébral et de morphologies intermédiaires pourrait indiquer que la frontière entre les deux sous-types astrocytaires est fine. Cependant, comme ils expriment des marqueurs moléculaires différents, il serait intéressant de comprendre la manière dont ils changent de morphologie et d'expression génique, et si cela est dépendant de signaux externes (venant des méninges par exemple), et dans quel ordre chronologique cela se produit. Nous avons observé des paires de cellules EdU+ contenant les deux sous-types astrocytaires montrant qu'ils peuvent provenir de divisions locales tardives mais l'identité de la cellule initiale (protoplasmique, piale ou progénitrice intermédiaire) est inconnue. L'absence de morphologies intermédiaires prolifératives indiquerait que les astrocytes conserveraient leur morphologie complexe ramifiée au cours de leur division. L'utilisation de techniques d'imagerie biophotoniques multicolores en temps réel sur tranches épaisses ou grâce à des

fenêtres craniales permettrait de mieux comprendre le mode de division et la morphogénèse de ces astrocytes résidents à condition toutefois que ces protocoles ne fassent pas entrer ces astrocytes dans un processus d'astroglie (astrocytes réactifs).

Par ailleurs la méthode StarTrack montre des clones d'astrocytes presque exclusivement protoplasmiques ou fibreux (dans la substance blanche), suggérant qu'ils sont générés par des progéniteurs indépendants (García-Marqués and López-Mascaraque, 2013), il serait intéressant de vérifier ce résultat avec notre stratégie. Cependant la densité de marquage obtenue dans le corps calleux avec les électroporations des MAGIC Markers sous contrôle du promoteur ubiquitaire CAG étant extrêmement importante, une adaptation de la méthode est à prévoir pour pouvoir effectuer des analyses clonales fiables.

Astrocytes – Oligodendrocytes

Ces travaux de thèse se sont focalisés sur les populations astrocytaires, cependant, au cours de nos analyses clonales sur des animaux aux stades P7 et P21, nous avons repéré et quantifié un certain nombre de clones gliaux composés de cellules n'ayant ni une morphologie astrocytaire (ou alors très immature et morphologiquement non reconnaissable), ni neuronale (catégorie « autre ») dans le cortex cérébral (Figure 58a). Ainsi 8.5% des clones observés n'étaient pas astrocytaires, 8% contenaient des astrocytes protoplasmiques et d'autres cellules, 0.25% contenaient des astrocytes piaux et d'autres cellules, et 3.1% contenaient les trois catégories, suggérant un lignage commun entre ces cellules (Figure 58a). Cependant, rien n'indique que ces proportions sont conservées chez l'adulte, le développement oligodendrocytaire étant plus tardif que celui des astrocytes.

Bien que notre étude se soit concentrée sur des stades développementaux (jusqu'à P21), nous avons laissé des animaux électroporés à E14 avec les MAGIC Markers vieillir jusqu'à trois et six mois (Figure 58b). Ces échantillons révèlent des clones de très grande taille (plus de 50-100 cellules) de cellules à morphologie oligodendrocytaire ou NG2, Olig2 négatifs, à la fois dans les six couches corticales mais aussi au niveau du corps calleux. Selon les utilisateurs de la méthode StarTrack (toujours avec un promoteur GFAP), une grande partie de ces cellules, formant d'immenses clones de plusieurs centaines de cellules (dont la taille augmente

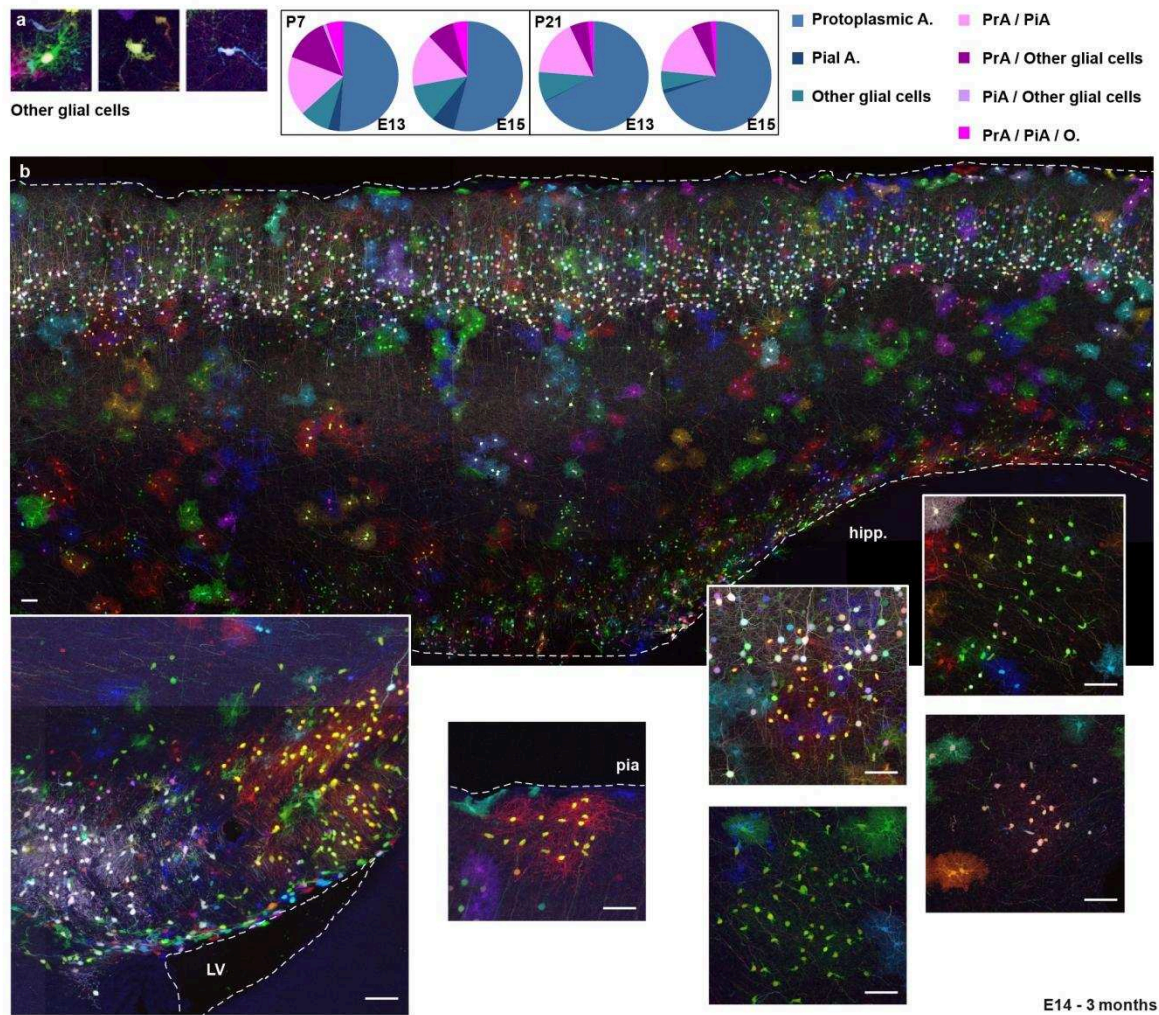


Figure 58. Potentialité des progéniteurs corticaux individuels à générer plusieurs sous-types gliaux.

(a) Exemples d'autres types gliaux observés à P7 et générés par les progéniteurs corticaux ciblés par électroporation *in utero* des MAGIC Markers entre E13 et E15 et proportions des types de clones homogènes et hétérogènes observés à P7 et P21. (b) Vue sagittale du cortex cérébral âgé de trois mois après électroporation *in utero* des MAGIC Markers à E14 et exemples de clones observés au niveau du corps calleux, de la surface piaie et au milieu du parenchyme cortical.

Projections maximales d'images confocales de coupes sagittales de 80 μm . Barres d'échelle : 50 μm .

progressivement et massivement jusqu'à au moins l'âge de 8 mois) après électroporations *in utero* à E14 des progéniteurs du pallium dorsal, sont NG2+ (García-Marqués et al., 2014). Il a été montré que les cellules NG2+ pouvaient produire des astrocytes (Zhu et al., 2007), à moins que ces cellules NG2+ ne disparaissent au cours de ce processus, nous devrions donc retrouver dans nos échantillons des clones composés des deux types cellulaires. Nos observations préliminaires ne révèlent pas de combinaisons de couleurs complexes partagées entre les cellules NG2+ et des astrocytes, et les électroporations des MAGIC Markers dans les souris *Olig2Cre* n'ont révélé qu'un seul clone non exclusivement astrocytaire mais cela mérite des quantifications approfondies afin de déterminer si les cellules NG2+ et/ou les oligodendrocytes ainsi que les astrocytes proviennent d'un progéniteur commun, et à quel stade du développement ces différents lignages divergent. D'après leur disposition dans le parenchyme cortical, il est fort probable que ces cellules se divisent massivement et localement à des stades tardifs postnataux, à la manière des astrocytes mais en formant des clusters uniques et peu dispersés dont la dynamique de prolifération reste à déterminer.

Astrocytes – Cellules épendymaires

En exploitant les techniques de suivi du lignage hautement résolutive MAGIC Markers et MADM au cours d'un projet auquel j'ai collaboré, l'équipe de Nathalie Spassky montre que les cellules B1 et les cellules épendymaires sont issues d'un progéniteur commun (Ortiz Alvarez et al., en révision, en annexe). Ces cellules de la glie radiaire produisent d'abord des cellules B1 par division symétrique et asymétrique puis les cellules épendymaires sont générées par une division terminale symétrique grâce à une régulation opérée par les membres de la famille des gémmines (connues pour leur rôle dans le contrôle de la réplication de l'ADN et la régulation du lignage cellulaire, elles sont fortement exprimées dans les cellules B1 en prolifération). Les expériences ayant été conduites dans la zone ventriculaire ventrale, il serait intéressant de vérifier ces résultats au niveau du pallium dorsal et d'effectuer des analyses clonales afin d'identifier un éventuel progéniteur commun entre ces cellules et les astrocytes protoplasmiques et piaux que nous avons étudiés.

Astrocytes – Neurones

En électroporant les MAGIC Markers à E13 dans les progéniteurs corticaux, nous observons des combinaisons de couleurs communes entre astrocytes

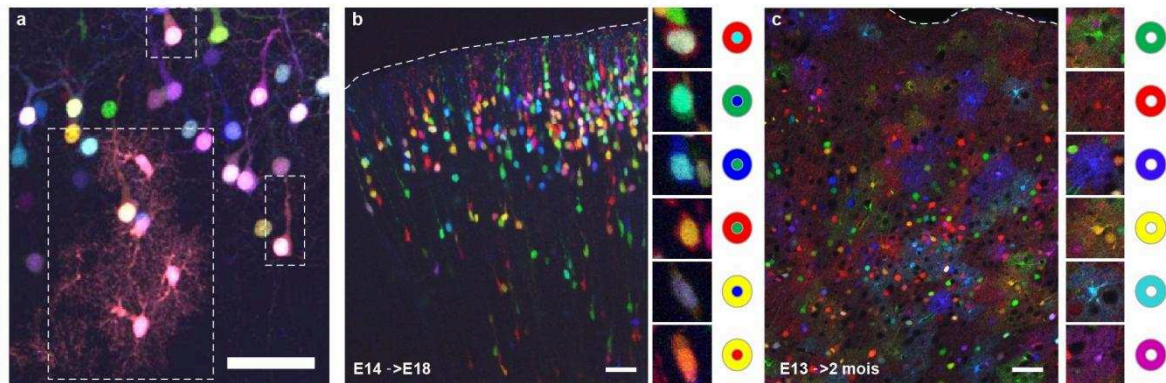


Figure 59. Stratégies d'étude du lignage commun entre astrocytes et neurones dans le cortex cérébral.

(a) Astrocytes et neurones partageant des combinaisons de couleurs complexes à P7 après électroporation des MAGIC Markers dans les progéniteurs corticaux au stade E15. (b) L'électroporation *in utero* de la SeCre dans les embryons *Devbow ;Devbow* au stade E14 montre à E18 des combinaisons de couleurs complexes dans les neurones pyramidaux, ainsi qu'un marquage multicolore neuronal et astrocytaire à 2 mois (c).

(b-c) : images : K. Loulier. Barres d'échelle : 50 μ m.

protoplasmiques et neurones pyramidaux (Figure 59a). Cependant le marquage épisomal présent dans les neurones nous empêche d'effectuer des analyses clonales fiables avec cette stratégie. Si le lignage commun astrocytes – neurones n'est pas nouveau (Magavi et al., 2012; Gao et al., 2014), l'organisation clonale précise de ces cellules et au sein d'autres colonnes corticales formées par des progéniteurs voisins n'est pas connue, de même que les interactions entre cellules sœurs de type différent dans les différentes couches corticales. Ces différents aspects pourront être approfondis grâce à l'électroporation de la SeCre dans les souris multicolores MAGIC Markers, pour marquer de manière stable et distincte avec des combinaisons de couleurs complexes les progéniteurs corticaux ainsi que leur descendance neuronale et gliale en s'affranchissant des inconvénients liés à l'utilisation de vecteurs épisomaux (Figure 59b-c).

2. Maturation du réseau astroglial

Notre étude illustre et analyse pour la première fois l'architecture clonale des astrocytes corticaux en trois dimensions dans un grand volume, la manière dont les cellules sont interconnectées entre elles ainsi que leur maturation morphologique à l'échelle individuelle.

2.1. Organisation du réseau astroglial au cours du développement

Nos analyses montrent une grande diversité de l'architecture clonale astrocytaire et par conséquent de la dispersion des cellules qui occupent des volumes clonaux extrêmement variables. Si leur organisation globale, qui se stabilise dès la première semaine postnatale semble suivre le mode colonnaire précédemment documenté (Magavi et al., 2012), l'étendue des capacités de dispersion des astrocytes semble avoir été sous estimée. De plus, si le volume clonal augmente globalement avec le nombre de cellules dont les clones sont composés, le nombre de cellules par clone n'est probablement pas le seul élément à jouer un rôle dans l'occupation spatiale clonale, et la position des premiers astrocytes générés à partir des cellules de glie radiaire est sûrement déterminante, expliquant le nombre variable d'éléments déconnectés (clusters ou cellules isolées) retrouvés au sein de chaque clone.

Beaucoup de questions restent cependant en suspens concernant l'organisation des astrocytes qui forment chez l'adulte un réseau continu de cellules aux territoires exclusifs. A partir de quel stade développemental le réseau astroglial est-il continu? Nos observations sont en faveur d'une absence de continuité du réseau aux stades précoces. En effet, notre modèle suggère une dispersion des astrocytes dans tout le parenchyme cortical une fois générés à partir des progéniteurs embryonnaires et postnataux suivie d'une prolifération locale en accord avec les études précédentes (Burns et al., 2009; Ge et al., 2012), et d'une complexification de leur morphologie. Pour appuyer ces résultats, il serait néanmoins nécessaire d'analyser la couverture astrocytaire à des stades précoces en utilisant par exemple le croisement de souris transgéniques multicolores MAGIC Markers avec des souris *Emx1Cre* ou *Olig2Cre* voire *Aldh11Cre* afin de couvrir l'ensemble des différentes populations astrocytaires au cours du développement et comparer la densité et la taille des astrocytes observés à une couverture théorique maximale.

2.2. Maturation morphologique

Les analyses quantitatives de l'arborisation astrocytaire sont très récentes. L'utilisation de marqueurs tels que GFAP (Kulkarni et al., 2015; Tavares et al., 2017) (Figure 60a), S100 β ou Aldh11 ne permettant pas d'évaluer toute l'étendue de la complexité morphologique des astrocytes, ce n'est qu'avec l'arrivée récente des protéines rapportrices comme la GFP, en lignée transgénique ou en électroporation que la cartographie de leur arborisation est devenue possible. La technique de modélisation développée par nos collaborateurs (E. Hernandez et G. Bonvento, Cea, Fontenay-aux-Roses) est la première à proposer une segmentation semi-automatisée aussi aboutie qui génère des données complétant et approfondissant des résultats publiés récemment. Des analyses de surfaces astrocytaires assez imprécises réalisées sur Imaris (Bitplane) (Figure 60b) et de Sholl (nombre d'intersections entre les branches et des cercles concentriques virtuels émanant du centre du soma) (Sholl, 1953) sur des prolongements d'astrocytes en culture marqués avec l'EGFP se sont malgré tout révélées suffisantes pour montrer une augmentation de la complexité astrocytaire entre P7 et P21 dans le cortex cérébral murin (Stogsdill et al., 2017) que nos résultats confirment. Des analyses de Sholl et de volumes sur des astrocytes isolés marqués avec MADM et effectuées avec FilamentTracer sur Imaris (Bitplane) montrent également une complexité largement

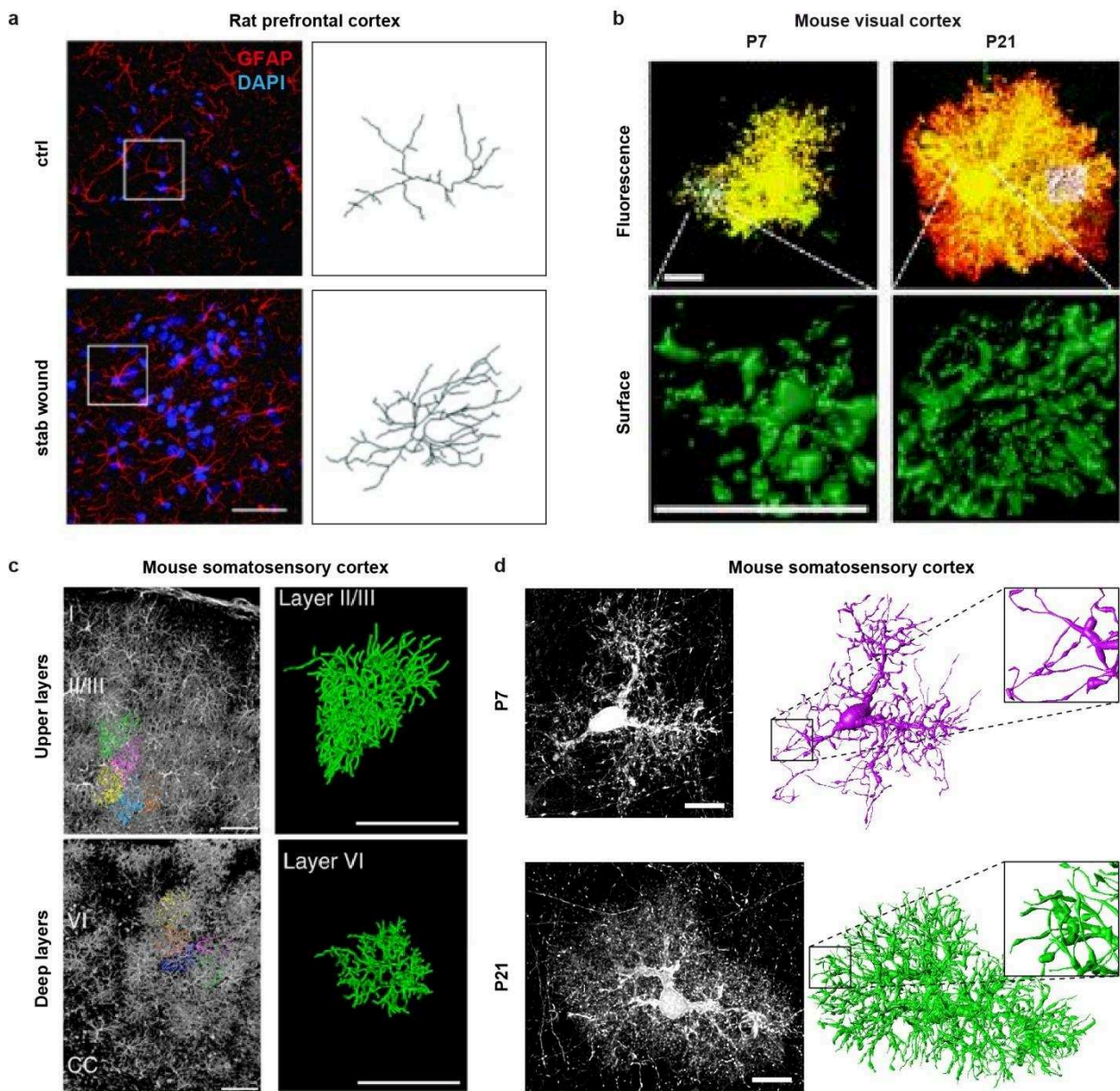


Figure 60. Stratégies d'analyse de la morphologie astrocytaire.

(a) Reconstructions d'astrocytes corticaux de rat à partir d'immunomarquages GFAP en situation contrôlée ou de lésion (*d'après Tavares et al., 2017*). (b) Modélisation d'astrocytes corticaux murins exprimant des protéines fluorescentes endogènes avec des surfaces (Imaris) (*d'après Stogsdill et al., 2017*). (c) Modélisation d'astrocytes corticaux de souris Glast-EMTB-GFP à P60 avec Filament Tracer (Imaris) à partir des microtubules marqués (*d'après Lanjakornsiripan et al., 2018*). (d) Modélisation d'astrocytes corticaux marqués avec les MAGIC Markers grâce au plugin Vaa3D- Neuron2 Auto Tracing Based on APP2 (Images et modèles : E. Hernandez, barres d'échelles : 10 μ m).

sous estimée par rapport à celle mesurée avec nos outils ainsi qu'un volume inférieur à P21 (20 000 μm^3 en moyenne contre 70 000 μm^3 avec notre stratégie) (Beattie et al., 2017). Une étude récente utilisant des souris Glast-EMTB-GFP pour marquer les microtubules astrocytaires et la méthode de transparence CUBIC (Susaki et al., 2014) pour reconstruire la morphologie astrocytaire dans le cortex cérébral montre des volumes déjà plus proches de nos ordres de grandeur à P60 (80-100 000 μm^3) (Lanjakornsiripan et al., 2018) (Figure 60c). Là encore la complexité des branches est évaluée par des analyses de Sholl sans indication du nombre de ramifications avec de plus une incertitude sur le fait qu'elles soient toutes modélisées. Notre stratégie apporte ces informations sur les ramifications (Figure 60d) mais manque peut-être elle aussi les ramifications les plus fines à cause d'une résolution insuffisante et que des différences observées entre P7 et P21 soient sous-estimées puisque les analyses étant effectuées sur des coupes de 80 μm , seuls les astrocytes contenus intégralement dans cette épaisseur ont été comptabilisés. Pour contrer ces limitations il faudrait augmenter la résolution des images tout en augmentant l'épaisseur des couches via l'imagerie biphotonique par exemple.

Notre stratégie apporte également des informations sur l'épaisseur des branches, qui n'a pas été étudiée jusqu'à présent (mise à part la description, sans quantifications, de branches principales et de branches secondaires, basées sur des marquages GFAP+) et qui mériterait d'être approfondie dans de futurs projets. Des questions relatives à la caractérisation des branches astrocytaires restent notamment en suspens : les branches s'affinent-elles au cours du développement tandis que les astrocytes augmentent en taille ? Nos résultats montrent que le volume des arborisations reconstruites (différent du volume territorial) augmente de P7 à P21, suggérant que la formation de nouvelles branches ne se fait pas par segmentation des branches existantes (ou du moins pas intégralement), mais ne cela veut pas dire qu'il n'y a pas également un affinement. Est-ce que l'épaisseur des branches est homogène au sein du territoire astrocytaire ou est-ce que celles-ci s'affinent en s'éloignant du corps cellulaire ? D'après les modèles reconstruits, cela semble être le cas, avec cependant des variations d'épaisseur le long des branches. Il serait intéressant de comprendre le rôle physiologique de ces bourrelets. Qu'en est-il des terminaisons astrocytaires en contact avec les vaisseaux sanguins pour les astrocytes juxtavacuaires ? Sont-elles plus épaisses et/ou plus densément

organisées ? A quel moment du développement ce contact se met-il en place ? Des analyses morphologiques associées avec des marquages immunohistochimiques comme l'isolectin B4 ou CD31 (marquage des cellules endothéliales) seraient à envisager pour répondre à ces questions.

Quels sont les mécanismes moléculaires sous-tendant cette complexification morphologique au cours du développement ? La famille des neuroligines (protéines d'adhésion cellulaire), exprimées dans les astrocytes, a été récemment décrite comme intervenant dans la morphogenèse astrocytaire, la formation et le fonctionnement des synapses excitatrices au cours du développement cortical, via les neurexines neuronales (Stogsdill et al., 2017). De manière intéressante, les auteurs de cette étude réalisée dans le cortex visuel, montrent que cette morphogenèse intervient directement en lien avec l'activité sensorielle (l'ouverture des yeux dans ce cas précis). Une autre étude montre que la perturbation de Lgl1 induit un délai de croissance morphologique des astrocytes protoplasmiques corticaux qui est cependant compensé dès P21 (Beattie et al., 2017). Cependant, l'étude de la morphogenèse astrocytaire en est encore à ses débuts et nul doute que des mécanismes de régulation supplémentaires restent encore à découvrir.

En étudiant la morphologie des astrocytes dans le cortex cérébral, Lanjakornsiripan et ses collègues montrent, entre autres, des différences morphologiques entre les astrocytes des différentes couches corticales (Lanjakornsiripan et al., 2018), ce qui pose à présent la question de l'hétérogénéité des astrocytes au sein d'un environnement neuronal divisé en couches corticales distinctes.

3. Hétérogénéité des astrocytes au sein des différentes couches corticales

Grâce à nos analyses clonales multicolores, plusieurs dizaines de milliers de cellules ont été analysées (57235). De ces observations, le résultat majeur se trouve être la variabilité des astrocytes au sein des différentes couches corticales, à l'échelle morphologique et proliférative, et qui pourrait être mise en relation avec une hétérogénéité fonctionnelle.

3.1. Hétérogénéité morphologique

Mes analyses volumétriques d'astrocytes montrent une hétérogénéité morphologique dépendant partiellement de leur localisation dans le parenchyme cortical. N'ayant pas utilisé de marqueurs de couches, nous n'avons pas réalisé d'analyses spécifiques de couches corticales du fait de la stratégie d'imagerie en grand volume Chrom-SMP utilisée pour ces mesures, incompatible avec des immunomarquages. Il aurait fallu travailler sur coupes épaisses, avec le risque que les anticorps aient une pénétration limitée et que les astrocytes de grande taille soient tronqués. Par ailleurs, un seul marqueur aurait pu être utilisé à la fois, dans la bande spectrale infrarouge, les MAGIC Markers occupant déjà les autres bandes spectrales dont nous disposons. J'ai pu cependant observer que les astrocytes proches du corps calleux et de la surface piaie sont moins volumineux que les autres. Ces observations sont compatibles avec les analyses tridimensionnelles de Lanjakornsiripan et ses collègues qui montrent également des différences dans l'orientation des cellules et l'étendue de leur arborisation entre les astrocytes des couches corticales II/II et ceux de la couche VI (Lanjakornsiripan et al., 2018). Ils montrent ainsi que dans les couches II/III, les astrocytes sont allongés verticalement, vers la surface piaie, alors que dans la couche VI ils s'allongent horizontalement et ont une arborisation moins complexe. Les astrocytes étant impliqués dans les transmissions synaptiques, ces morphologies spécifiques ont probablement un lien avec la morphologie des neurones dans ces différentes couches (densité dendritique et synaptique), elles-mêmes directement liées aux rôles et projections de ces neurones au sein des différentes couches corticales.

3.2. Hétérogénéité moléculaire et fonctionnelle

Les populations astrocytaires sont hétérogènes sur le plan morphologique mais également sur le plan moléculaire. Cependant cet aspect n'a pas été abordé au cours de mes travaux et mériterait d'être approfondi. Avec de multiples stratégies de séquençage d'ARN, de spectrophotométrie de masse, d'électrophysiologie, de microscopie électronique en volume et des analyses fonctionnelles immunohistochimiques et morphologiques, Chai et ses collègues ont montré de manière très complète les différences morphologiques, fonctionnelles et moléculaires entre les astrocytes hippocampaux et striataux (Chai et al., 2017). Il serait très intéressant de faire la comparaison avec les astrocytes des différentes couches

corticales. Lanjakornsiripan et ses collègues ont quant à eux montré premièrement des différences d'interactions synaptiques astrocytes-neurones en microscopie électronique et deuxièmement des différences d'expression génique entre les couches II/III et la couche VI après dissection des couches corticales de souris *Aldh1l1-eGFP*, tri des cellules par FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) et séquençage d'ARN. Par ailleurs, chez les souris *reeler*, *Dab1* (disabled-1 gene, régulateur de la voie de signalisation reeline impliqué dans la migration neuronale) et *Dab1^{fl/fl};NexCre* (neuronal helix-loop-helix protein-1, spécifique des neurones), les différences moléculaires et morphologiques entre les astrocytes des couches inférieures et supérieures sont modifiées, suggérant une importance capitale de la voie de signalisation reeline et plus spécifiquement l'organisation des couches neuronales dans l'établissement de la morphologie astrocytaire (Lanjakornsiripan et al., 2018). Comme c'est le cas pour les neurones, les astrocytes pourraient par conséquent avoir des rôles spécifiques dépendant de leur localisation dans le parenchyme cortical, et probablement du type de neurones situés à proximité.

Les astrocytes de la couche I présentent en particulier une activité calcique différente de celle des astrocytes des couches II/III (Takata and Hirase, 2008). Les astrocytes étant impliqués dans plusieurs aspects de la plasticité corticale développementale et adulte dans des zones spécifiques, leurs rôles spécifiques pourraient être liés aux cartes corticales (López-Hidalgo and Schummers, 2014). Parmi ces cartes corticales, on peut citer le très étudié cortex à tonneaux, qui est la zone somatosensorielle corticale de la couche IV recevant des informations en provenance des vibrisses chez les rongeurs, où l'activité calcique des astrocytes est liée à l'activité synaptique et où de nombreuses fonctions particulières des astrocytes du contrôle neuronal et synaptique ont été identifiées (Schipke et al., 2008; Benedetti et al., 2011; Han et al., 2014; Sims et al., 2015). Bien que mes travaux ne se soient pas concentrés sur ces structures, il serait intéressant de regarder s'il y a une organisation clonale particulière à l'intérieur des tonneaux et si les cellules sœurs y ont des interactions privilégiées. Des analyses clonales tridimensionnelles avec les MAGIC Markers, mais aussi fonctionnelles (visualisation de l'activité calcique par exemple) ainsi que transcriptomiques (séquençage d'ARN) et protéomiques sur cellules sœurs pourraient apporter des réponses à ces questions.

3.3. Hétérogénéité proliférative

Le caractère hétérogène de la prolifération gliale postnatale a essentiellement été étudié par comparaisons entre types gliaux et/ou régions cérébrales, souvent chez l'adulte (Gensert and Goldman, 2001; Emsley and Macklis, 2006) et/ou dans la substance blanche (Gensert and Goldman, 1996). Très peu d'études ont été réalisées dans le cortex cérébral et encore moins au sein des différentes couches corticales. Les quelques études focalisées sur la prolifération locale astrocytaire de la période périnatale à la fin du développement ne font pas de distinction entre les différentes couches corticales (Ge et al., 2012; Moroni et al., 2018) voire n'analysent pas les couches inférieures avec des injections de rétrovirus rapporteurs de la GFP infectant les cellules en division effectuées dans les couches I à IV (Ge et al., 2012).

Mes résultats montrent premièrement que les clones d'astrocytes situés dans les couches supérieures du cortex cérébral sont de plus grande taille, que ceux situés dans les couches inférieures, qu'ils soient composés d'un ou plusieurs sous-types d'astrocytes. Deuxièmement, les astrocytes corticaux en prolifération MAGIC Markers+/EdU+ sont situés en majorité dans les couches corticales supérieures. Une densité astrocytaire plus importante dans les couches supérieures serait-elle responsable de ces différences ? Bien que je n'aie pas quantifié la densité astrocytaire dans les différentes couches corticales, mes observations ne semblent pas aller dans ce sens. De plus, dans les souris *Aldh1L1-EGFP*, la zone de couverture EGFP par astrocyte est stable dans les couches I à VI à P7 et P21 (Stogsdill et al., 2017).

Une activité mitogénique plus importante pourrait expliquer la présence de groupe clonaux plus gros, cependant ne peuvent pas être exclus i) un phénomène physiologique de mort cellulaire au cours du développement cortical qui serait variable entre les couches corticales, aspect que je n'ai pas abordé au cours de cette étude et ii) des étapes de prolifération locale temporellement différentes en fonction des couches corticales, comme suggéré par Ichikawa et collaborateurs qui proposent un développement cortical astrocytaire basé sur un modèle "inside-out" à l'instar des neurones (Ichikawa et al., 1983). Cela signifierait dans ce cas que ces populations plus prolifératives situées dans les couches supérieures ont été générées plus tardivement à partir des progéniteurs de la glie radiaire et que mes électroporations n'ont pas été effectuées assez tôt pour cibler les premières transitions gliogéniques

des progéniteurs corticaux, et donc marquer les populations astrocytaires qui en sont issues. Cela pourrait également expliquer pourquoi malgré la détection de cellules S100 β + dans le cortex cérébral à E18 – P0 et P1, aucune n'exprime de MAGIC Markers. Cependant, le fait que nous retrouvons des cellules dans tout le parenchyme cortical sans apparente préférence de positionnement et ce quel que soit le stade d'électroporation des MAGIC Markers (E13 ou E15) ne semble pas aller dans ce sens. Ces derniers éléments posent à présent la question des origines des astrocytes corticaux et de la contribution de celle-ci à l'hétérogénéité observée au cours de ces travaux.

4. Origine de l'hétérogénéité astrocytaire

L'hétérogénéité des astrocytes pourrait être expliquée par l'existence de lignages séparés, d'une plasticité des cellules différenciées ou d'une combinaison de ces deux paramètres (Hewett, 2009). Au cours de ces travaux, j'ai mis en évidence la double contribution des progéniteurs embryonnaires et postnataux à la formation du réseau astroglial.

4.1. Contribution des progéniteurs prénataux au réseau astroglial

La méconnaissance du développement astrocytaire cortical précoce est telle qu'il est difficile de répondre à la simple question « quand apparaissent les premiers astrocytes ? » Les astrocytes sont détectés par immunomarquage de l'antigène GFAP dès E16 dans la moelle épinière de souris (Liu et al., 2002) mais les périodes précises de production astrocytaire dans le cortex cérébral sont moins bien connues, et cela en grande partie à cause de l'absence de marqueur précoce fiable. Nos analyses de cerveaux à E18 après électroporation des MAGIC Markers dans les progéniteurs corticaux à E15 ne montrant aucune cellule S100 β , on est même en droit de se demander si cette contribution embryonnaire existe réellement, de nombreuses publications scientifiques avançant que les astrocytes corticaux apparaissent à la fin de l'embryogenèse sans jamais le montrer explicitement ou en se basant sur des expériences réalisées dans d'autres structures cérébrales ou d'autres modèles animaux comme le furet (Voigt, 1989).

Beattie et ses collègues montrent de façon détournée la contribution embryonnaire des progéniteurs avec des marquages BLBP sur des échantillons

MADM+ (Beattie et al., 2017). Ce marqueur permet de visualiser les astrocytes, mais aussi les progéniteurs gliaux intermédiaires précoces et les cellules de glie radiaire (Feng et al., 1994). Les auteurs de l'étude considérant que les cellules BLBP+ qui ne contiennent pas de prolongements apicaux ou basaux sont exclusivement astrocytaires détectent ainsi ces cellules à partir d'E17 dans le parenchyme cortical murin. J'ai également détecté des cellules Aldh1l1+ à E18 dans le cortex cérébral, cependant celles-ci ne colocalisent pas avec les cellules issues des progéniteurs électroporés à E15. A moins que ces cellules proviennent d'une autre source que le pallium dorsal, E15 serait peut-être un stade trop tardif pour cibler les premières divisions gliogéniques, la transition gliogénique ayant été montrée se déroulant avant la fin de la neurogenèse (Gao et al., 2014). Nous avons toujours estimé que nous ciblions les progéniteurs corticaux avant la gliogenèse parce que nous n'observons aucun astrocyte marqué en électroporant les MAGIC Markers à E13 ou E15 sans transposase, mais ces populations étant extrêmement prolifératives, les marqueurs multicolores sont peut être dilués avant nos observations postnatales. L'étude des premiers astrocytes générés est d'autant plus difficile qu'ils se répartissent et se divisent rapidement dans le parenchyme cortical, rendant leur suivi avec des marqueurs de prolifération qui se diluent au fur et à mesure des divisions, comme l'EdU, délicat. Il y a donc un réel besoin d'identifier des marqueurs stables et précoces des astrocytes.

Nos résultats obtenus avec l'immunomarqueur Olig2 et/ou les souris transgéniques *Olig2Cre* dans lesquelles les plasmides MAGIC Markers ont été électroporés montrent des cellules MAGIC Markers+/Olig2+ dans le parenchyme cortical dès E18 (nous ne pouvons pas exclure, cependant, que certaines d'entre elles ne deviendront pas des astrocytes). Cette stratégie d'électroporation des MAGIC Markers dans les souris *Olig2Cre* génère 60% d'astrocytes protoplasmiques et indique qu'Olig2 intervient dans le lignage astrocytaire. Est-ce que tous les astrocytes corticaux sont concernés ? Les résultats obtenus avec les croisements *Olig2Cre ;Devbow* indiquent qu'au moins 80% des astrocytes S100β+ proviennent du lignage Olig2, cependant, cela n'indique pas à quel moment du lignage astrocytaire ce facteur de transcription intervient (glie radiaire, progéniteur intermédiaire, astrocytes différenciés). Des analyses clonales exhaustives sur les animaux *Olig2Cre* électroporés avec les MAGIC Markers n'ont pas pu être réalisées,

cependant mes observations révèlent des clones étendus, composés de plusieurs clusters et dont la taille serait à comparer avec celle des clones astrocytaires mesurés dans des souris sauvages pour avoir une idée du stade de développement où intervient la transition Olig2+ dont l'expression persiste par ailleurs jusqu'à des stades tardifs dans les astrocytes.

De nos observations et des différents travaux publiés sur le sujet (Marshall et al., 2005; Cai et al., 2007; Ono et al., 2008; Chen et al., 2008; Moroni et al., 2018; Tatsumi et al., 2018), plusieurs éléments ressortent : pendant le développement, les astrocytes immatures, avec une morphologie peu ramifiée, n'exprimeraient pas la protéine GFAP mais le facteur de transcription Olig2, ce qui serait aussi le cas, plus faiblement, d'astrocytes plus matures, GFAP+, dans le cortex cérébral et la substance blanche. Olig2 serait donc exprimé de façon transitoire dans les astrocytes immatures pendant les stades postnatals précoces, puis inhibé dans les astrocytes matures, mais pas dans les astrocytes réactifs, au contraire, et l'expression continue forcée d'Olig2 ne permettrait pas d'aboutir à des astrocytes matures, à morphologie complexe (Marshall et al., 2005). Cependant mes résultats indiquent que des astrocytes frères, très proches, peuvent exprimer Olig2 de manière différentielle sans que leur morphologie apparente n'apparaisse différente. Il serait cependant nécessaire de comparer la complexité de leurs arborisations respectives pour s'en assurer. Les astrocytes pourraient ensuite revenir à une forme immature et réactive en cas de lésion corticale, où l'expression d'Olig2 leur permettrait de ré-entrer dans le cycle cellulaire et de proliférer (Chen et al., 2008). Mes travaux montrent de plus et pour la première fois qu'Olig2 est impliqué dans le lignage des astrocytes de la surface piale.

L'implication d'Olig2 dans le lignage panglial semble évidente, mais est-il indispensable au lignage astrocytaire ? Une étude montre que ce facteur de transcription est important pour la formation des astrocytes de la substance blanche, mais pas ceux de la substance grise (Cai et al., 2007). Des études associant KO conditionnel Olig2 et analyses clonales multicolores devraient pouvoir nous éclairer sur le rôle d'Olig2 dans la formation du réseau astroglial et ce au cours du développement prénatal mais aussi postnatal, qui constitue d'après mes résultats une phase importante de la gliogenèse.

4.2. Contribution des progéniteurs postnatals au réseau astroglial

L'existence même de cette contribution fait l'objet de controverses depuis plusieurs années. Une étude peu citée parue en 2013 montre la production de quelques astrocytes GFAP+ dans le cortex cérébral (substances blanche et grise, sans préférence de positionnement apparente dans les différentes couches corticales) par les progéniteurs de la zone sous ventriculaire avec des électroporations postnatales à P0 de plasmides codant la GFP (Wang et al., 2013). D'autre part, bien qu'ils ne présentent pas ce résultat en tant que tel, la technique de marquage des astrocytes corticaux de Stogsdill et ses collègues par électroporation postnatale de plasmides codant l'eGFP et la mCherry à la membrane dans le but de réaliser des analyses morphologiques montre elle aussi que les progéniteurs postnatals de la zone sous ventriculaire peuvent produire des astrocytes corticaux (Stogsdill et al., 2017). Bien que les travaux de Goldman et d'autres groupes montrent une contribution de la zone sous ventriculaire postnatale à la génération d'astrocytes corticaux, (Smart, 1961; Lewis, 1968; Levison and Goldman, 1993; Luskin and McDermott, 1994), l'étude de Ge et ses collègues, citée dans pas moins de 110 articles depuis sa parution en 2012, soutient que cette contribution est très limitée, après des électroporations de vecteurs épisomaux sous promoteur CAGG codant la GFP (Ge et al., 2012). Mes travaux montrent que cette même méthode d'électroporation, mais utilisant cette fois-ci des vecteurs intégratifs et non plus épisomaux, permet le marquage de cette contribution postnatale et confirment ce résultat avec des électroporations de SeCre dans les souris multicolores *Devbow*. La raison pour laquelle cette contribution a été minimisée est probablement la dilution des vecteurs épisomaux utilisés par d'autres groupes, dans une population extrêmement proliférative. Reste à caractériser l'identité de ces cellules progénitrices.

La présence de progéniteurs gliaux Nestin+ proliférant au niveau de la zone sous ventriculaire (Burns et al., 2009) suggère que ce sont les cellules ciblées par électroporation postnatale et les croisements *NestinCreERT2;Devbow* avec injections uniques de tamoxifène de P0 à P5 semblent indiquer que cette contribution postnatale diminue progressivement jusqu'à P5. Cependant l'absence d'expression de la Nestine par les astrocytes différenciés peut être discutée. Mes expériences préliminaires d'une part montrent que la Nestine ne colocalise pas avec des

marqueurs astrocytaires dans le parenchyme cortical (S100 β , GFAP) et une autre étude d'autre part a montré que les cellules de la glie radiaire passent par une phase d'expression des antigènes GLAST+/Nestin+ avec une production préférentielle de neurones, puis par une phase GLAST+/Nestin- responsable de la production d'astrocytes (Siddiqi et al., 2014), ce qui suggère que les astrocytes différenciés n'expriment pas la Nestine. Cependant, une étude montre au contraire la localisation des mRNA Nestin au niveau des protrusions d'astrocytes en culture (Thomsen et al., 2013), à pondérer néanmoins par le constat que les astrocytes en culture sont plus proches morphologiquement et moléculairement des astrocytes réactifs où l'astroglie implique notamment l'expression de la Nestine (Sofroniew, 2014) que des astrocytes résidents. Il est donc difficile de conclure définitivement sur l'expression de la Nestine dans les astrocytes différenciés en développement en se basant sur ces éléments. Plus convaincantes, les données provenant de séquençage d'ARN soutiennent que l'expression de la Nestine diminue progressivement de P1 à P7 dans les astrocytes du cerveau antérieur (mais la distinction substances blanche/grise n'est pas claire dans cette étude) jusqu'à disparaître à P17 (Cahoy et al., 2008). Par ailleurs des immunomarquages dans le cortex cérébral de rat semblent montrer une expression de la Nestine dans des cellules à morphologie astrocytaire de P0 à P9 et progressivement restreinte à la zone sous ventriculaire à P18 (Kálmán and Ajtai, 2001).

Par conséquent les effets de nos injections de tamoxifène dans les souris *NestinCreERT2 ; Devbow* ou *NestinCreERT2 ; RosaSTOPtdTomato* durant la première semaine postnatale ne sont peut-être pas restreints aux cellules progénitrices Nestin+ de la zone ventriculaire postnatale, comme préalablement supposé. Il est donc nécessaire de pondérer nos résultats car nous ne pouvons pas exclure que les cellules marquées grâce à cette stratégie rendent compte également des divisions postnatales locales d'astrocytes exprimant toujours la Nestine dans le parenchyme cortical. Par ailleurs, nos résultats obtenus avec les croisements *RosaSTOPtdTomato ; Nestin-CreERT2* montrent que les cellules générées après la naissance à partir de cellules Nestin+ à P0, stade d'injection du tamoxifène, se situent préférentiellement dans les couches supérieures du cortex cérébral, où nous avons aussi observé une prolifération locale astrocytaire postnatale importante. Ces deux éléments seraient compatibles avec une possible expression de la Nestine par

les astrocytes immatures en division. Malgré tout, ces considérations ne remettent pas en cause la double contribution embryonnaire/postnatale observée (mais plutôt les proportions de chacune) qui ne semble pas, par ailleurs, être à l'origine de la diversité clonale que nous avons mise en évidence (nombre et sous-types d'astrocytes générés).

L'électroporation postnatale des MAGIC Markers ou autres rapporteurs Cre-dépendants dans des souris *NestinCre* pourrait confirmer que les (ou certains) progéniteurs postnatals générant des astrocytes sont effectivement Nestin+ mais ne permettrait pas de différencier les progéniteurs électroporés dans la zone ventriculaire postnatale et exprimant la Nestine de la zone ventriculaire postnatale des progéniteurs électroporés dans la zone ventriculaire postnatale et exprimant la Nestine une fois qu'ils ont atteint le parenchyme cortical. Un moyen de vérifier l'existence d'un flux de migration à partir des cellules de la zone ventriculaire postnatale Nestin+ générant des astrocytes serait de déclencher la recombinaison à P0 dans des souris *NestinCreERT2 ; RosaSTOPtdTomato* et de regarder 24h, 48h et 72h après si l'on observe un front de migration depuis la zone sous ventriculaire vers la surface piale. Cependant nos résultats précédents montrent que la répartition des premiers astrocytes générés se fait rapidement dans tout le parenchyme cortical, un tel front de migration pourrait donc ne pas exister. En effet, le processus de transdifférenciation des cellules de la glie radiaire en astrocytes (Misson et al., 1991), qui les amène à rétracter leurs prolongements apicaux et leur corps cellulaire dans le parenchyme alors qu'elles sont toujours rattachées à la surface piale, pourrait conduire à un positionnement des futurs astrocytes haut dans le parenchyme sans qu'il n'y ait nécessairement de migration active depuis la zone ventriculaire. De nouvelles stratégies restent donc à établir afin de différencier de manière fiable les contributions pré et postnatales des progéniteurs corticaux à la formation du réseau astroglial. D'autre part il reste également à déterminer si ces contributions pré- et post-natales correspondraient à des populations de progéniteurs différents.

Y-aurait-il d'autres sources d'astrocytes que celles que nous ciblons par électroporation *in vivo* au niveau du pallium dorsal ? Les croisements *Emx1Cre ; Devbow* d'une part semblent montrer une couverture astrocytaire totale du parenchyme cortical, et les électroporations *in utero* et postnatales que nous avons réalisées chez la souris en ciblant la zone ventriculaire ventrale cette fois avec le

vecteur intégratif Tol2CAGmEYFP (données non présentées) d'autre part, ne marquent pas d'astrocytes au niveau des zones somatosensorielles et visuelles du cortex cérébral. Ces différents éléments, ainsi que l'absence d'autres travaux de recherche proposant d'autres origines, suggèrent que les progéniteurs de la zone ventriculaire dorsale sont l'unique source d'astrocytes corticaux, via une production pré- et post-natale d'astrocytes qui vont rapidement se répartir dans tout le parenchyme cortical et proliférer localement. Cependant les mécanismes régulant ce positionnement initial et la migration astrocytaire restent encore à déterminer.

5. Mécanismes de régulation de la migration des astrocytes dans le cortex cérébral murin

Les acteurs moléculaires régulant la migration des astrocytes dans le cortex cérébral murin pouvant expliquer l'organisation et la dispersion clonales observées sont encore méconnus. En particulier, le positionnement des astrocytes est-il intrinsèquement déterminé et/ou dépendant de signaux environnementaux ? Une publication récente montre que la voie de signalisation reeline et plus spécifiquement l'organisation des couches neuronales jouent un rôle dans l'établissement de la morphologie astrocytaire (Lanjakornsiripan et al., 2018) pointant les neurones voisins comme sources de signaux instructeurs pour les astrocytes. D'autres voies de signalisation à caractère autonome cellulaire et/ou non autonome cellulaire pourraient-elles être impliquées dans les mécanismes de migration astrocytaires ?

Nos résultats préliminaires indiquent que la signalisation éphrine B1, exprimée par les astrocytes, pourrait être impliquée dans ces processus. Les méthodologies mises au point au cours de ce projet de thèse (imagerie et analyses clonales tridimensionnelles) et restant à perfectionner (perturbations génétiques mosaïques gain et perte de fonction) permettront dans des projets futurs de caractériser le rôle de la signalisation éphrine B1, dans la régulation de l'astrogliogenèse (prolifération et migration). Des expériences de gain ou perte de fonction où les formes constitutivement active ou dominante négative de l'éphrine B1 associées à une quatrième couleur seront combinées aux MAGIC Markers par électroporation *in utero* et analysées par microscopie confocale sur coupes immunomarquées ou par microscopie bi-photonique sur échantillon épais pour reconstruire en trois dimensions le cortex cérébral marqué et caractériser la dispersion spatiale des astrocytes

perturbés et non-perturbés. Pour cela, des expériences complémentaires à ces travaux de thèse pouvant impliquer des études de toxicité et/ou la modification de la construction (remplacement de la séquence 2A par un système IRES par exemple) seront nécessaires afin de pouvoir visualiser les cellules perturbées. La séquence 2A permet de produire la protéine perturbée et la protéine fluorescente rapportrice avec un seul ARN messenger grâce à un clivage co-translationnel (Trichas et al., 2008). Le système IRES (Internal Ribosome Entry Site), quant à lui, permet également de produire la protéine perturbée et la protéine fluorescente rapportrice avec un seul ARN messenger mais utilise en revanche un site d'entrée ribosomal interne pour séparer les différentes régions codantes pendant la traduction.

Une fois la stratégie de perturbation validée, plusieurs paramètres pourront ainsi être étudiés : i) l'état prolifératif des astrocytes avec les marqueurs Ki67 (cellules en prolifération), EdU (cellules en phase S) et PH3 (cellules en phase M), ii) leur identité par immunomarquages anti-GFAP, anti-S100 β ou anti Aldh1L1, et par caractérisation de leur morphologie et de leur localisation (substance blanche, parenchyme, surface piaie), iii) leur dissémination dans le cortex et l'organisation générale du cortex cérébral, et iv) le volume occupé par chaque astrocyte et ses interactions avec les astrocytes et neurones voisins, en particulier le maintien ou non de domaines astrocytaires non chevauchant décrits dans la littérature (Bushong et al., 2004). D'ores et déjà, mes résultats préliminaires semblent indiquer que l'éphrine B1 joue un rôle dans l'espacement régulier des astrocytes dans le parenchyme cortical et le maintien des frontières des domaines formés par leurs prolongements. Les éphrines et leurs récepteurs se concentrant au niveau des terminaisons synaptiques neuronales corticales mais aussi pour certaines d'entre elles au niveau de l'arborisation pérисynaptique des astrocytes (Murai and Pasquale, 2011), il serait intéressant d'étudier l'implication de cette communication neurones-astrocytes dans la régulation de l'astroglionèse et de ses mécanismes migratoires. L'analyse du phénotype des astrocytes perturbés et des cellules voisines avec notre stratégie de perturbation mosaïque permettra ainsi de caractériser le rôle de l'éphrine B1 dans la formation et la structuration du réseau astroglial. Le caractère autonome cellulaire et/ou non autonome cellulaire de l'action de cette voie de signalisation pourra être déterminé grâce à des perturbations spécifiques des neurones ou des astrocytes utilisant les promoteurs spécifiques NeuroD1 (facteur de transcription à motifs hélice-

boucle-hélice impliqué dans la différenciation neuronale) (Lee et al., 1995) ou Aldh1L1 par exemple et grâce aux analyses clonales des clones perturbés et non perturbés. Par ailleurs les résultats d'une étude récente dans le cortex cérébral en développement indiquent que la signalisation directe Eph-B déclenche des changements épigénétiques à long terme dans cellules souches neurales embryonnaires en corrélation avec la différenciation et la suppression de l'auto-renouvellement (Fawal et al., 2018), un résultat qui pourrait expliquer la variabilité observée dans le nombre d'astrocytes générés par les progéniteurs corticaux, et à prendre en compte dans l'analyse de futures perturbations de la signalisation Ephrine B1, selon que la perturbation est effectuée dès le stade progéniteur ou seulement dans les astrocytes.

Elucider les mécanismes du développement astroglial aux cours des différentes étapes de prolifération, différenciation, migration et maturation est indispensable pour en comprendre les dysfonctionnements en situation pathologique et ainsi découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter des maladies liées aux astrocytes.

6. Le développement astroglial, un enjeu de santé publique

Les astrocytes sont impliqués dans de nombreuses pathologies neurologiques humaines dont quelques unes n'impliquent originellement que des astrocytes et nombre d'entre elles sont associées à des perturbations neuronales (Molofsky et al., 2012).

Les glioblastomes

Les principales tumeurs cérébrales sont les gliomes dont au moins 80% sont constituées d'astrocytomes (ou glioblastomes), des tumeurs malignes touchant une population majeure de cellules gliales: les astrocytes (Placone et al., 2016). Ces tumeurs touchent environ 5000 nouveaux patients chaque année en France, avec une espérance de vie médiane de 15 à 17 mois (Stupp et al., 2014) et un taux de survie de 5 % à cinq ans (Ostrom et al., 2014). Très agressifs, les glioblastomes diffusent souvent dans des régions éloignées du site tumoral. Par conséquent, les ablations chirurgicales sont insuffisantes pour éliminer toutes les cellules tumorales. De plus, ces opérations sont suivies de traitements par radiothérapie et

chimiothérapie auxquels les tumeurs sont souvent résistantes (DeAngelis, 2001). Des nouveaux traitements des gliomes astrocytaires sont donc nécessaires, et pour identifier des cibles thérapeutiques efficaces, il est important de comprendre les mécanismes de prolifération et de migration des astrocytes en contexte physiologique.

Impliqués dans le développement et l'homéostasie des tissus, les acteurs de la voie de signalisation Eph/éphrine jouent aussi un rôle dans la cancérogenèse, où ils véhiculent une communication cellule-à-cellule aberrante à l'intérieur de la tumeur mais également entre la tumeur et son micro-environnement (Pasquale, 2010). Par ailleurs, Olig2 a été montré impliqué dans le contrôle de la réplication dans les cellules souches neurales et les gliomes chez la souris (Ligon et al., 2007). D'un point de vue développemental, la poursuite des travaux sur l'éphrine B1 et sur Olig2 mais aussi d'autres molécules candidates permettra de caractériser certaines molécules impliquées dans la régulation de la prolifération et de la migration des astrocytes, ouvrant la voie à une meilleure compréhension de la formation et de l'expansion des gliomes et, dans de futurs projets, la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter ces tumeurs malignes. D'autre part, les cellules d'une même tumeur présentent fréquemment une hétérogénéité phénotypique, moléculaire et fonctionnelle et certaines peuvent être hiérarchisées avec des cellules tumorigéniques cancéreuses se différenciant en cellules non tumorigéniques, rendant les glioblastomes très hétérogènes, et donc difficiles à traiter (Meacham and Morrison, 2013; Aum et al., 2014). Des analyses clonales pourraient être envisagées après nucléofection des MAGIC Markers dans des biopsies de tumeurs humaines ensuite greffées dans le cerveau de souris immunodéficientes afin d'étudier plus spécifiquement le développement tumoral en termes de prolifération et de dispersion cellulaire dans les différentes régions cérébrales et l'hétérogénéité cellulaire des glioblastomes, mais aussi pour vérifier l'implication de molécules candidates, ou cibles thérapeutiques, dans l'évolution tumorale.

La maladie d'Alexander

La maladie d'Alexander est l'unique maladie connue aujourd'hui comme étant due à une mutation d'une protéine spécifiquement astrocytaire (GFAP). Les patients (presque exclusivement des enfants) atteints de cette maladie présentent une macrocéphalie, une substance blanche anormale et des retards développementaux

(Quinlan et al., 2007). Chez ces patients, la morphologie astrocytaire est perturbée. Les astrocytes sont hypertrophiés, avec des augmentations du niveau d'expression de la GFAP et l'accumulation de fibres Rosenthal (agrégats de protéines cytoplasmiques dont la GFAP), et de petites protéines de choc thermique (hsp27 et alphaB-crystallin) (Olabarria and Goldman, 2017). Dans plusieurs modèles murins de la maladie d'Alexander, le phénotype astrocytaire est altéré dans l'hippocampe mais aussi dans le néocortex, deux zones où l'expression de la GFAP est par ailleurs très variable en situation normale (faible dans le néocortex, et forte dans l'hippocampe) (Khakh and Sofroniew, 2015), jusqu'à une perte de la morphologie buissonnante caractéristique des astrocytes protoplasmiques, due à la réduction des fines ramifications distales. Les cellules deviennent également multinucléées et hypertrophiées et perdent certains contacts avec les astrocytes voisins au détriment probable des neurones et oligodendrocytes voisins (Sosunov et al., 2013). Cette altération du phénotype astrocytaire est hétérogène, avec des astrocytes d'apparence normale voisins d'astrocytes morphologiquement modifiés (Sosunov et al., 2013), sans que cette hétérogénéité ait pu être associée à l'existence de différentes populations astrocytaires accumulant différents niveaux de GFAP. Là encore, la compréhension des mécanismes impliqués dans la morphogenèse astrocytaire, l'établissement des territoires individuels et des contacts entre astrocytes, mais aussi l'étude de l'hétérogénéité des populations astrocytaires devrait apporter des pistes de réflexion pour élaborer des traitements jusqu'ici inexistantes.

La famille des neuroligines a été récemment décrite comme intervenant dans la morphogenèse astrocytaire, la formation et le fonctionnement des synapses excitatrices au cours du développement cortical (Stogsdill et al., 2017), cependant, les auteurs de l'étude ne constatent aucune différence d'expression de la GFAP avec ou sans neuroligine, ce qui suggère l'existence d'autres mécanismes impliqués dans la morphogenèse astrocytaire et la maladie d'Alexander, qui restent encore à découvrir.

Les troubles psychiatriques

Plusieurs études ont montré des changements de nombre de cellules gliales et de leurs caractéristiques moléculaires au niveau du cerveau de patients adultes atteints de troubles psychiatriques ou dans des modèles murins équivalents, avec en particulier une réduction de l'expression de la GFAP voire une dégénération gliale

dans les zones limbiques et préfrontales dans des modèles de dépression chez le rat (Gosselin et al., 2009; Smiałowska et al., 2013), confirmés par l'induction de comportements dépressifs chez le rat après injection de gliotoxines et perte de cellules GFAP+ (Banasr and Duman, 2008). Cependant, si l'altération du facteur neurotrophique dérivé de la glie (ou GDNF, qui favorise la survie neuronale) et de S100 β pourrait être impliquée dans les troubles bipolaires (Keshavarz, 2017), les mécanismes de dégénération gliale sont encore méconnus et nécessitent des études approfondies pour découvrir de nouveaux traitements ciblant directement les cellules gliales qui pourront inhiber leur dégénération voire favoriser leur régénération en ciblant les acteurs de la régulation de la prolifération gliale.

L'épilepsie

Les astrocytes présentent des morphologies altérées dans de nombreuses pathologies du système nerveux central. Ils deviennent « réactifs » avec l'activation de la GFAP et l'hypertrophie apparente des corps cellulaires et des ramifications. Dans plusieurs modèles murins d'épilepsie (maladie neurologique résultant d'une hyperexcitabilité neuronale paroxystique conduisant à des décharges anormales de potentiel d'action d'un ensemble de neurones et entraînant des crises convulsives (Stafstrom and Carmant, 2015)), parallèlement à des changements fonctionnels, les astrocytes corticaux perdent leur organisation en domaines non recouvrants tandis que la densité des épines dendritiques augmente sur les neurones excitateurs (Oberheim et al., 2008) sans que l'on sache dans quel ordre cela se produit et si l'un de ces défauts est la cause de l'autre. Cependant cette perturbation de l'organisation en territoires n'est pas toujours associée à l'astrogliose et semble restreinte aux pathologies épileptiques puisque qu'elle est notamment préservée dans un modèle murin d'Alzheimer (Oberheim et al., 2008). Il serait intéressant de vérifier cette restriction en étudiant d'autres modèles pathologiques et en particulier les troubles neurodéveloppementaux comme l'autisme ou encore l'hyperactivité mais aussi d'identifier les mécanismes de régulation de l'établissement de ces domaines astrocytaires et de déterminer s'ils sont à l'origine de l'épilepsie idiopathique (non liée à des lésions), considérée comme génétique. Ces travaux permettront d'explorer de nouvelles pistes pour traiter les causes de la maladie et non plus seulement les symptômes, (les crises) comme c'est le cas des traitements antiépileptiques actuels

qui ont pour objectif de diminuer l'hyperexcitabilité neuronale et qui doivent souvent être poursuivis tout au long de la vie.

Conclusions

Bien que l'étude du fonctionnement du système nerveux remonte au 18^e siècle avec la découverte de la bioélectricité, les neurosciences sont restées majoritairement centrées sur les neurones jusqu'à très récemment, bien après la découverte des cellules gliales. Les astrocytes sont passés d'une population passive impliquée dans la survie neuronale à des acteurs centraux de l'activité synaptique et des fonctions cérébrales, et font par conséquent l'objet de nombreux travaux de recherche depuis quelques dizaines d'années. Ainsi ils ne sont plus considérés aujourd'hui comme une population cellulaire homogène mais au contraire comme une population très diverse à l'échelle fonctionnelle, morphologique, moléculaire, inter et intra régions mais dont les origines développementales sont encore méconnues. Dans cette perspective plus « gliocentrée », je me suis attachée pendant mes travaux de thèse à décrire la mise en place du réseau astroglial *in vivo* depuis les stades précoces de développement jusqu'à sa stabilisation au cours des premières semaines postnatales. Ces travaux ont permis de caractériser d'une part les séquences développementales de la formation du réseau astroglial cortical à l'échelle de la population mais également de la cellule, et de révéler d'autre part la grande diversité des populations astrocytaires corticales à l'échelle clonale qui comprend une importante hétérogénéité en termes d'organisation structurale mais également de nombre et de sous-types d'astrocytes générés par les progéniteurs corticaux. Mes travaux n'ont malheureusement pas pu élucider les origines de cette diversité qui pourrait être liée à la plasticité importante des astrocytes matures (réactivité, motilité, fonctions diverses) en fonction de leur environnement.

Il reste par conséquent encore beaucoup à découvrir concernant le développement astroglial cortical et en particulier au niveau de l'identification des mécanismes de régulation impliqués dans les différentes étapes de l'astrogliogenèse. Pour cela de nouveaux marqueurs précoces d'astrocytes constitueront des outils essentiels. De futurs travaux visant à élucider les voies de signalisation contribuant à la prolifération, la différenciation, la migration et le positionnement des astrocytes au sein des différentes couches corticales seront

nécessaires. La découverte des éléments régulateurs intervenant dans la maturation morphologique et territoriale des astrocytes mais aussi dans l'acquisition de leurs nombreuses fonctions au sein d'un environnement neuronal existant apportera de nouveaux éléments indispensables à la compréhension de nombreuses pathologies cérébrales, et à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour ces pathologies, dont les composantes gliales, en général, et astrocytaires, en particulier, ne peuvent plus être ignorées.

Remerciements

Aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail et particulièrement à Pascale Durbec et Alexandre Pattyn pour leur travail de rapporteurs, leur enthousiasme sur le projet et leurs remarques constructives sur le manuscrit initial, à Fiona Francis pour sa relecture attentive de l'article principal et ses commentaires constructifs, et à Gilles Bonvento pour avoir suivi le projet depuis le début en faisant partie de mon comité de suivi de thèse ;

A tous ceux qui ont travaillé dans l'ombre pendant toutes ces années, qui m'ont apporté une grande aide et rendu ce projet possible : Jason et plus récemment Marion avec le génotypage, Vanessa puis Andrei avec la gestion des souris, Mickaël et Emeline sur la partie Ephrine, Marie D. qui m'a formée à l'électroporation postnatale, Dragos sur la fin du projet et Vera du côté administratif ; à ceux dont j'ai profité de l'expérience et qui m'ont accompagnée dans l'aventure clearing : Katie, David, Hanen et Chloé ; à Stéphane, gardien des microscopes, toujours disponible pour gagner une bataille contre un confocal récalcitrant ou un disque plein, à toute heure du jour ou de la nuit, du lundi au dimanche ;

A nos collaborateurs, Edwin et Gilles pour leur précieux apport au projet et ces fantastiques données morphologiques sur les astrocytes ; à Lamiae et Emmanuel, à qui on doit les magnifiques acquisitions en grand volume d'échantillons corticaux multicolores, pour leur aide, leur gentillesse et leurs nombreuses explications sur le fonctionnement du microscope bi-photonique à la novice en optique que je suis ; mille mercis tout particulièrement à Lamiae, camarade de thèse du début à la fin, avec qui ce fut un réel plaisir de travailler, toujours enthousiaste et optimiste, rigoureuse dans son travail et passionnée par les neurosciences, l'exemple parfait d'un succès interdisciplinaire et à qui je souhaite une très belle carrière académique ; à Emilie, qui m'a formée à l'électroporation *in utero* avec patience et qui m'a confortée dans l'idée d'aller jusqu'au doctorat, pour ses nombreux conseils et son encadrement bienveillant ; à Sio qui m'a initiée à la programmation informatique et qui est resté très disponible pour me réconcilier avec Matlab en périodes difficiles, et à Yann qui m'a convaincue sans s'en douter que j'en étais capable ;

A tous les membres présents et passés de l'équipe S4 pour leur soutien et leur aide au quotidien, de l'équipe S2, nos voisins de paillasses et en particulier Céline et Amélie qui m'ont accueillie dans leur bureau quand je suis arrivée à l'IdV, et de l'équipe S1, fournisseurs officiels d'anticorps et de souris transgéniques et compagnons de longues soirées à l'IdV ; à Raphaëlle, cap'taine clonage encore invaincue, atout majeur de l'équipe pendant de nombreuses années, qui m'a formée à la biologie moléculaire avec gentillesse et bienveillance et qui n'a pas pu résister à l'appel du Sud ;

A Jean qui m'a accueillie dans l'équipe à bras ouverts, toujours motivé pour tester et faire découvrir de nouvelles choses, et avec qui j'ai pris, émerveillée, mes toutes premières images multicolores au confocal. Toujours disponible (même quand il n'a pas le temps) pour des réunions interminables et pour répondre à mes questions parfois naïves, il a su aborder le projet avec un œil critique indispensable à la production d'un travail de qualité tout en me laissant une grande autonomie au quotidien; à Karine, qui m'a encadrée de 2012, mon premier stage en laboratoire, à aujourd'hui, d'abord aux petits soins, puis avec de plus en plus d'autonomie et pour cela je lui en suis reconnaissante. Du génotypage à la chirurgie en passant par la manipulation des animaux et l'imagerie, elle m'a (presque) tout appris, mille mercis pour avoir porté ce projet avec une intégrité, un enthousiasme et un optimisme à toute épreuve, pour avoir partagé ses connaissances scientifiques et ses opinions sur le projet, mais aussi son réseau, pour m'avoir fait confiance et encouragée tout au long de la thèse et poussée vers le haut avec ses retours et propositions toujours constructifs, que ce soit sur le plan expérimental, dans ma recherche de post-doc, dans la rédaction de ma thèse ou pour participer à des congrès mais aussi sur le plan personnel, ce fut un vrai plaisir de travailler avec elle et j'espère que cela continuera, je lui souhaite beaucoup de réussite dans ses nouveaux projets et avec ceux qui auront la chance de faire partie de sa toute nouvelle équipe ;

A Caroline et Gaël, des enseignants grâce à qui on se rappelle pourquoi on aime la science, toujours disponibles au détour d'un couloir pour répondre à nos questions (ou parler de leurs vacances) : de vrais atouts dans un institut de recherche ; à Caroline tout spécialement, qui m'a mis des étoiles dans les yeux lorsqu'elle m'a parlé de la méthode Brainbow pour la première fois et sans qui je n'aurais jamais candidaté dans l'équipe de Jean ;

Aux membres présents et passés du bureau des doctorants le mieux décoré de l'IdV: Angélique, Antoine C., Giuliana, François, Chloé, Robin, Franck, Eljo, et Sergi pour leur soutien sur le plan personnel et scientifique tout au long de la thèse, leurs talents culinaires, leurs rires indescriptiblement incroyables et pour ces beaux moments passés ensemble qui rendent les week-ends passés au labo presque agréables ;

Aux fidèles membres du Lunch Group pour ces beaux moments passés ensemble, à tous ceux qui m'ont nourrie avant, pendant et après la rédaction de thèse avec de petits ou gros gâteaux à foison, avec une mention spéciale pour Sarah et Sandrine, trafiquantes officielles de fromage franc-comtois ; à tous ceux qui m'ont aidée durant mes déménagements presque annuels depuis mon arrivée à l'IdV (et qui seraient venus même sans l'appât des pizzas) ;

A l'équipe de rêve des meetings gastronomiques : Giuliana, Sergi et les François, pour ces dîners fantastiques, leur humour, leur enthousiasme et leur écoute patiente lors de mes humeurs ronchonnes, et à leurs merveilleuses familles qui nous ont accueillis si généreusement aux quatre coins de l'Europe ;

A Elodie, Tanguy et tous les médiateurs du Palais de la Découverte avec qui j'ai eu la chance de travailler, qui m'ont sortie du labo, fait découvrir de nouveaux horizons scientifiques et soutenue inconditionnellement professionnellement et personnellement !

A Oriol et Marcela, compagnons valeureux et à vélo, sur ce long chemin qu'est la thèse, pour tous leurs bons conseils et nos longues discussions qui ne font pas toujours avancer la science mais sont sans aucun doute toujours bonnes pour le moral ;

A Pierre, Delphine et Jérôme qui ont toujours été là et qui le seront toujours, pour leur amitié, leur humour et leur immense soutien qui j'espère, ne s'arrêteront pas aux frontières de la France ;

A toute ma famille, et en particulier mes parents, sans qui je n'aurais jamais pu faire de longues études, et qui m'ont toujours laissé le choix dans mon orientation, même lorsque ce n'était pas le leur ;

A tous ceux que j'ai oubliés, à ceux qui sont partis vers de nouveaux horizons, à vous tous, un immense merci pour cette aventure scientifique et humaine et ces cinq belles années passées avec vous !

Références

- Achúcarro y Lund, N. (1915). De l'évolution de la névroglie et spécialement de ses relations avec l'appareil vasculaire. *Trau Lab Rech Biol Univ Madr.* 169–212.
- Agulhon, C., Fiacco, T.A., and McCarthy, K.D. (2010). Hippocampal Short- and Long-Term Plasticity Are Not Modulated by Astrocyte Ca²⁺ Signaling. *Science* 327, 1250–1254.
- Ai, H., Shaner, N.C., Cheng, Z., Tsien, R.Y., and Campbell, R.E. (2007). Exploration of new chromophore structures leads to the identification of improved blue fluorescent proteins. *Biochemistry* 46, 5904–5910.
- Allaman, I., Bélanger, M., and Magistretti, P.J. (2011). Astrocyte–neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci.* 34, 76–87.
- Allen, N.J., Bennett, M.L., Foo, L.C., Wang, G.X., Chakraborty, C., Smith, S.J., and Barres, B.A. (2012). Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors. *Nature* 486, 410–414.
- Alliot, F., Godin, I., and Pessac, B. (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 117, 145–152.
- Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135, 1127–1128.
- Altman, J. (1963). Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat. Rec.* 145, 573–591.
- Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 137, 433–457.
- Alvarez-Buylla, A., and García-Verdugo, J.M. (2002). Neurogenesis in Adult Subventricular Zone. *J. Neurosci.* 22, 629–634.
- Anderson, M.A., Ao, Y., and Sofroniew, M.V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci. Lett.* 565, 23–29.
- Anderson, S.A., Eisenstat, D.D., Shi, L., and Rubenstein, J.L.R. (1997). Interneuron Migration from Basal Forebrain to Neocortex: Dependence on Dlx Genes. *Science* 278, 474–476.
- Anderson, S.A., Marín, O., Horn, C., Jennings, K., and Rubenstein, J.L. (2001). Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Dev. Camb. Engl.* 128, 353–363.
- Andriezen, W.L. (1893). The Neuroglia Elements in the Human Brain. *Br Med J Jul 29, (1700):* 227–230.
- Angevine, J.B., and Sidman, R.L. (1961). Autoradiographic Study of Cell Migration during Histogenesis of Cerebral Cortex in the Mouse. *Nature* 192, 766–768.
- Angevine, J.B., Bodian, D., Coulombre, A.J., Edds, M.V., Hamburger, V., Jacobson, M., Lyser, K.M., Prestige, M.C., Sidman, R.L., Varon, S., et al. (1970). Embryonic vertebrate central nervous system: Revised terminology. *Anat. Rec.* 166, 257–261.
- Anthony, T.E., and Heintz, N. (2007). The folate metabolic enzyme ALDH1L1 is restricted to the midline of the early CNS, suggesting a role in human neural tube defects. *J. Comp. Neurol.* 500, 368–383.
- Anthony, T.E., Klein, C., Fishell, G., and Heintz, N. (2004). Radial Glia Serve as Neuronal Progenitors in All Regions of the Central Nervous System. *Neuron* 41, 881–890.
- Antony, J.M., Paquin, A., Nutt, S.L., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2011). Endogenous microglia regulate development of embryonic cortical precursor cells. *J. Neurosci. Res.* 89, 286–298.

- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., and Haydon, P.G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* *22*, 208–215.
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H.R., Robitaille, R., and Volterra, A. (2014). Gliotransmitters Travel in Time and Space. *Neuron* *81*, 728–739.
- Arber, S., and Caroni, P. (1995). Thrombospondin-4, an extracellular matrix protein expressed in the developing and adult nervous system promotes neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* *131*, 1083–1094.
- Armulik, A., Genové, G., and Betsholtz, C. (2011). Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Dev. Cell* *21*, 193–215.
- Arnold, S.J., Huang, G.-J., Cheung, A.F.P., Era, T., Nishikawa, S.-I., Bikoff, E.K., Molnar, Z., Robertson, E.J., and Groszer, M. (2008). The T-box transcription factor Eomes/Tbr2 regulates neurogenesis in the cortical subventricular zone. *Genes Dev.* *22*, 2479–2484.
- Artavanis-Tsakonas, S. (1999). Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science* *284*, 770–776.
- Attwell, D., Buchan, A.M., Charkpak, S., Lauritzen, M., MacVicar, B.A., and Newman, E.A. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* *468*, 232–243.
- Aum, D.J., Kim, D.H., Beaumont, T.L., Leuthardt, E.C., Dunn, G.P., and Kim, A.H. (2014). Molecular and cellular heterogeneity: the hallmark of glioblastoma. *Neurosurg. Focus* *37*, E11.
- Bachoo, R.M., Kim, R.S., Ligon, K.L., Maher, E.A., Brennan, C., Billings, N., Chan, S., Li, C., Rowitch, D.H., Wong, W.H., et al. (2004). Molecular diversity of astrocytes with implications for neurological disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 8384–8389.
- Bagnard, D., Vaillant, C., Khuth, S.-T., Dufay, N., Lohrum, M., Püschel, A.W., Belin, M.-F., Bolz, J., and Thomasset, N. (2001). Semaphorin 3A–Vascular Endothelial Growth Factor-165 Balance Mediates Migration and Apoptosis of Neural Progenitor Cells by the Recruitment of Shared Receptor. *J. Neurosci.* *21*, 3332–3341.
- Bai, J., Ramos, R.L., Ackman, J.B., Thomas, A.M., Lee, R.V., and LoTurco, J.J. (2003). RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat. Neurosci.* *6*, 1277–1283.
- Ballas, N., Lioy, D.T., Grunseich, C., and Mandel, G. (2009). Non-cell autonomous influence of MeCP2-deficient glia on neuronal dendritic morphology. *Nat. Neurosci.* *12*, 311–317.
- Banasr, M., and Duman, R.S. (2008). Glial loss in the prefrontal cortex is sufficient to induce depressive-like behaviors. *Biol. Psychiatry* *64*, 863–870.
- Bandeira, F., Lent, R., and Herculano-Houzel, S. (2009). Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 14108–14113.
- Bardehle, S., Krüger, M., Buggenthin, F., Schwausch, J., Ninkovic, J., Clevers, H., Snippert, H.J., Theis, F.J., Meyer-Luehmann, M., Bechmann, I., et al. (2013). Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. *Nat. Neurosci.* *16*, 580–586.
- Barnabé-Heider, F., Wasylnka, J.A., Fernandes, K.J.L., Porsche, C., Sendtner, M., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2005). Evidence that Embryonic Neurons Regulate the Onset of Cortical Gliogenesis via Cardiotrophin-1. *Neuron* *48*, 253–265.
- Barres, B.A. (2008). The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. *Neuron* *60*, 430–440.
- Bayraktar, O.A., and Doe, C.Q. (2013). Combinatorial temporal patterning in progenitors expands neural diversity. *Nature* *498*, 449–455.

- Bayraktar, O.A., Fuentealba, L.C., Alvarez-Buylla, A., and Rowitch, D.H. (2015). Astrocyte Development and Heterogeneity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7.
- Beattie, R., and Hippenmeyer, S. (2017). Mechanisms of radial glia progenitor cell lineage progression. *FEBS Lett.* 591, 3993–4008.
- Beattie, R., Postiglione, M.P., Burnett, L.E., Laukoter, S., Streicher, C., Pauler, F.M., Xiao, G., Klezovitch, O., Vasioukhin, V., Ghashghaei, T.H., et al. (2017). Mosaic Analysis with Double Markers Reveals Distinct Sequential Functions of Lgl1 in Neural Stem Cells. *Neuron* 94, 517–533.
- Béchéde, C., Pascual, O., Triller, A., and Bessis, A. (2011). Nitric oxide regulates astrocyte maturation in the hippocampus: involvement of NOS2. *Mol. Cell. Neurosci.* 46, 762–769.
- Becker, K., Jährling, N., Kramer, E.R., Schnorrer, F., and Dodt, H.-U. (2008). Ultramicroscopy: 3D reconstruction of large microscopical specimens. *J. Biophotonics* 1, 36–42.
- Beckervordersandforth, R., Tripathi, P., Ninkovic, J., Bayam, E., Lepier, A., Stempfhuber, B., Kirchhoff, F., Hirrlinger, J., Haslinger, A., Lie, D.C., et al. (2010). In Vivo Fate Mapping and Expression Analysis Reveals Molecular Hallmarks of Prospectively Isolated Adult Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell* 7, 744–758.
- Belle, M., Godefroy, D., Dominici, C., Heitz-Marchaland, C., Zelina, P., Hellal, F., Bradke, F., and Chédotal, A. (2014). A Simple Method for 3D Analysis of Immunolabeled Axonal Tracts in a Transparent Nervous System. *Cell Rep.* 9, 1191–1201.
- Belle, M., Godefroy, D., Couly, G., Malone, S.A., Collier, F., Giacobini, P., and Chédotal, A. (2017). Tridimensional Visualization and Analysis of Early Human Development. *Cell* 169, 161-173.e12.
- Ben Haim, L., and Rowitch, D.H. (2017). Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 31–41.
- Benedetti, B., Matyash, V., and Kettenmann, H. (2011). Astrocytes control GABAergic inhibition of neurons in the mouse barrel cortex. *J. Physiol.* 589, 1159–1172.
- Bergles, D.E., and Richardson, W.D. (2015). Oligodendrocyte Development and Plasticity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a020453.
- Betschinger, J., Mechtler, K., and Knoblich, J.A. (2003). The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature* 422, 326.
- Bielas, S., Higginbotham, H., Koizumi, H., Tanaka, T., and Gleeson, J.G. (2004). Cortical neuronal migration mutants suggest separate but intersecting pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 593–618.
- Biglami, A., and Dahl, D. (1974). Astrocyte-specific protein and radial glia in the cerebral cortex of newborn rat. *Nature* 252, 55–56.
- Biglami, A., Eng, L.F., Dahl, D., and Uyeda, C.T. (1972). Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res.* 43, 429–435.
- Bishop, K.M., Goudreau, G., and O’Leary, D.D.M. (2000). Regulation of Area Identity in the Mammalian Neocortex by *Emx2* and *Pax6*. *Science* 288, 344–349.
- Bishop, K.M., Rubenstein, J.L.R., and O’Leary, D.D.M. (2002). Distinct Actions of *Emx1*, *Emx2*, and *Pax6* in Regulating the Specification of Areas in the Developing Neocortex. *J. Neurosci.* 22, 7627–7638.
- Bishop, K.M., Garel, S., Nakagawa, Y., Rubenstein, J.L.R., and O’Leary, D.D.M. (2003). *Emx1* and *Emx2* cooperate to regulate cortical size, lamination, neuronal differentiation, development of cortical efferents, and thalamocortical pathfinding. *J. Comp. Neurol.* 457, 345–360.

- Boutin, C., Diestel, S., Desoeuvre, A., Tiveron, M.-C., and Cremer, H. (2008). Efficient In Vivo Electroporation of the Postnatal Rodent Forebrain. *PLoS ONE* 3.
- Bozycki, L., Łukasiewicz, K., Matryba, P., and Pikula, S. (2018). Whole-body clearing, staining and screening of calcium deposits in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Skelet. Muscle* 8, 21.
- Brancaccio, M., Patton, A.P., Chesham, J.E., Maywood, E.S., and Hastings, M.H. (2017). Astrocytes Control Circadian Timekeeping in the Suprachiasmatic Nucleus via Glutamatergic Signaling. *Neuron* 93, 1420-1435.e5.
- Brückner, G., and Biesold, D. (1981). Histochemistry of glycogen deposition in perinatal rat brain: importance of radial glial cells. *J. Neurocytol.* 10, 749–757.
- Buffo, A., Vosko, M.R., Erturk, D., Hamann, G.F., Jucker, M., Rowitch, D., and Gotz, M. (2005). Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: Implications for neuronal repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 18183–18188.
- Buffo, A., Rite, I., Tripathi, P., Lepier, A., Colak, D., Horn, A.-P., Mori, T., and Gotz, M. (2008). Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 3581–3586.
- Burns, K.A., Murphy, B., Danzer, S.C., and Kuan, C.-Y. (2009). Developmental and post-injury cortical gliogenesis: a genetic fate-mapping study with Nestin-CreER mice. *Glia* 57, 1115–1129.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., and Ellisman, M.H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 183–192.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., and Ellisman, M.H. (2003). Examination of the relationship between astrocyte morphology and laminar boundaries in the molecular layer of adult dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 462, 241–251.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., and Ellisman, M.H. (2004). Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 22, 73–86.
- Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., et al. (2008). A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function. *J. Neurosci.* 28, 264–278.
- Cai, J., Chen, Y., Cai, W.-H., Hurlock, E.C., Wu, H., Kernie, S.G., Parada, L.F., and Lu, Q.R. (2007). A crucial role for Olig2 in white matter astrocyte development. *Development* 134, 1887–1899.
- Campbell, K. (2003). Dorsal-ventral patterning in the mammalian telencephalon. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 50–56.
- Campbell, K., and Götz, M. (2002). Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. 4.
- Cardona, A., Saalfeld, S., Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Preibisch, S., Longair, M., Tomancak, P., Hartenstein, V., and Douglas, R.J. (2012). TrakEM2 Software for Neural Circuit Reconstruction. *PLoS ONE* 7, e38011.
- Cassiani-Ingoni, R., Coksaygan, T., Xue, H., Reichertschvner, S., Wiendl, H., Rao, M., and Magnus, T. (2006). Cytoplasmic translocation of Olig2 in adult glial progenitors marks the generation of reactive astrocytes following autoimmune inflammation. *Exp. Neurol.* 201, 349–358.

- Caviness, V.S. (1982). Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: A developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Dev. Brain Res.* *4*, 293–302.
- Caviness, V.S., and Rakic, P. (1978). Mechanisms of Cortical Development: A View From Mutations in Mice. *Annu. Rev. Neurosci.* *1*, 297–326.
- Cepko, C., Ryder, E.F., Austin, C.P., Walsh, C., and Fekete, D.M. (1995). Lineage analysis using retrovirus vectors. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 387–419.
- Chaboub, L.S., and Deneen, B. (2012). Developmental Origins of Astrocyte Heterogeneity: The Final Frontier of CNS Development. *Dev. Neurosci.* *34*, 379–388.
- Chai, H., Diaz-Castro, B., Shigetomi, E., Monte, E., Oceau, J.C., Yu, X., Cohn, W., Rajendran, P.S., Vondriska, T.M., Whitelegge, J.P., et al. (2017). Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence. *Neuron* *95*, 531–549.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* *263*, 802–805.
- Chan-Ling, T., and Stone, J. (1991). Factors determining the migration of astrocytes into the developing retina: Migration does not depend on intact axons or patent vessels. *J. Comp. Neurol.* *303*, 375–386.
- Chen, Y., Miles, D.K., Hoang, T., Shi, J., Hurlock, E., Kernie, S.G., and Lu, Q.R. (2008). The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Olig2 Is Critical for Reactive Astrocyte Proliferation after Cortical Injury. *J. Neurosci.* *28*, 10983–10989.
- Choi, B.H. (1981). Radial glia of developing human fetal spinal cord: Golgi, immunohistochemical and electron microscopic study. *Dev. Brain Res.* *1*, 249–267.
- Choi, B.H., and Lapham, L.W. (1978). Radial glia in the human fetal cerebrum: a combined Golgi, immunofluorescent and electron microscopic study. *Brain Res.* *148*, 295–311.
- Christopherson, K.S., Ullian, E.M., Stokes, C.C.A., Mallowney, C.E., Hell, J.W., Agah, A., Lawler, J., Mosher, D.F., Bornstein, P., and Barres, B.A. (2005). Thrombospondins Are Astrocyte-Secreted Proteins that Promote CNS Synaptogenesis. *Cell* *120*, 421–433.
- Chung, K., and Deisseroth, K. (2013). CLARITY for mapping the nervous system. *Nat. Methods* *10*, 508–513.
- Chung, W.-S., Allen, N.J., and Eroglu, C. (2015). Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *7*, a020370.
- Colombo, J.A., and Reisin, H.D. (2004). Interlaminar astroglia of the cerebral cortex: a marker of the primate brain. *Brain Res.* *1006*, 126–131.
- Conklin, E.G. (1906). The Organization and Cell-lineage of the Ascidian Egg. *Science* *23*, 340–344.
- Cornell-Bell, A., Finkbeiner, S., Cooper, M., and Smith, S. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* *247*, 470–473.
- Costa, M.R., Buchholz, O., Schroeder, T., and Götz, M. (2009). Late Origin of Glia-Restricted Progenitors in the Developing Mouse Cerebral Cortex. *Cereb. Cortex* *19*, i135–i143.
- Couly, G.F., and Le Douarin, N.M. (1987). Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. *Dev. Biol.* *120*, 198–214.
- Culican, S.M., Baumrind, N.L., Yamamoto, M., and Pearlman, A.L. (1990). Cortical radial glia: identification in tissue culture and evidence for their transformation to astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *10*, 684–692.

- Cuoghi, B., and Mola, L. (2009). Macroglial cells of the teleost central nervous system: a survey of the main types. *Cell Tissue Res.* *338*, 319–332.
- Dahl, D., and Bignami, A. (1973). Immunochemical and immunofluorescence studies of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates. *Brain Res.* *61*, 279–293.
- Davis, L.K., Meyer, K.J., Rudd, D.S., Librant, A.L., Epping, E.A., Sheffield, V.C., and Wassink, T.H. (2008). Pax6 3' deletion results in aniridia, autism and mental retardation. *Hum. Genet.* *123*, 371–378.
- Dawson, M., Polito, A., Levine, J.M., and Reynolds, R. (2003). NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol. Cell. Neurosci.* *24*, 476–488.
- Dawson, M.R.L., Levine, J.M., and Reynolds, R. (2000). NG2-expressing cells in the central nervous system: Are they oligodendroglial progenitors? *J. Neurosci. Res.* *61*, 471–479.
- DeAngelis, L.M. (2001). Brain tumors. *N. Engl. J. Med.* *344*, 114–123.
- deAzevedo, L.C., Fallet, C., Moura-Neto, V., Dumas-Duport, C., Hedin-Pereira, C., and Lent, R. (2003). Cortical radial glial cells in human fetuses: depth-correlated transformation into astrocytes. *J. Neurobiol.* *55*, 288–298.
- DeFelipe, J., Alonso-Nanclares, L., and Arellano, J.I. (2003). Microstructure of the neocortex: Comparative aspects. *J. Neurocytol.* *31*, 18.
- Dehay, C., Kennedy, H., and Kosik, K.S. (2015). The Outer Subventricular Zone and Primate-Specific Cortical Complexification. *Neuron* *85*, 683–694.
- Deiters, O. (1865). Untersuchungen über Gehirn und Rückenmark des Menschen und der Säugethier.
- Dekkers, M.P.J., and Barde, Y.-A. (2013). Developmental biology. Programmed cell death in neuronal development. *Science* *340*, 39–41.
- Delaunay, B. (1934). “Sur la sphère vide”. A la mémoire de Georges Voronoi. *Bull. Académie Sci. URSS Cl. Sci. Mathématiques Nat.* *6*, 793–800.
- Deneen, B., Ho, R., Lukaszewicz, A., Hochstim, C.J., Gronostajski, R.M., and Anderson, D.J. (2006). The Transcription Factor NFIA Controls the Onset of Gliogenesis in the Developing Spinal Cord. *Neuron* *52*, 953–968.
- Denk, W., Strickler, J.H., and Webb, W.W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* *248*, 73–76.
- Derouiche, A., Pannicke, T., Haseleu, J., Blaess, S., Grosche, J., and Reichenbach, A. (2012). Beyond polarity: functional membrane domains in astrocytes and Müller cells. *Neurochem. Res.* *37*, 2513–2523.
- Di Castro, M.A., Chuquet, J., Liaudet, N., Bhaukaurally, K., Santello, M., Bouvier, D., Tiret, P., and Volterra, A. (2011). Local Ca²⁺ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nat. Neurosci.* *14*, 1276–1284.
- Dimidschstein, J., Passante, L., Dufour, A., van den Amele, J., Tiberi, L., Hrechdakian, T., Adams, R., Klein, R., Lie, D.C., Jossin, Y., et al. (2013). Ephrin-B1 Controls the Columnar Distribution of Cortical Pyramidal Neurons by Restricting Their Tangential Migration. *Neuron* *79*, 1123–1135.
- Distler, C., Dreher, Z., and Stone, J. (1991). Contact spacing among astrocytes in the central nervous system: An hypothesis of their structural role. *Glia* *4*, 484–494.

- Doetsch, F., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *17*, 5046–5061.
- Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. *Cell* *97*, 703–716.
- Doyle, J.P., Dougherty, J.D., Heiman, M., Schmidt, E.F., Stevens, T.R., Ma, G., Bupp, S., Shrestha, P., Shah, R.D., Doughty, M.L., et al. (2008). Application of a Translational Profiling Approach for the Comparative Analysis of CNS Cell Types. *Cell* *135*, 749–762.
- Dunn, K.W., Sandoval, R.M., Kelly, K.J., Dagher, P.C., Tanner, G.A., Atkinson, S.J., Bacallao, R.L., and Molitoris, B.A. (2002). Functional studies of the kidney of living animals using multicolor two-photon microscopy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *283*, C905-916.
- Duque, A., and Rakic, P. (2011). Different Effects of Bromodeoxyuridine and [3H]Thymidine Incorporation into DNA on Cell Proliferation, Position, and Fate. *J. Neurosci.* *31*, 15205–15217.
- Dutrochet, H. (1824). *Recherches anatomiques et physiologiques sur la structure intime des animaux et des végétaux, et sur leur motilité.* JB Baillière Libr. Paris.
- Dwyer, N.D., Chen, B., Chou, S.-J., Hippenmeyer, S., Nguyen, L., and Ghashghaei, H.T. (2016). Neural Stem Cells to Cerebral Cortex: Emerging Mechanisms Regulating Progenitor Behavior and Productivity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *36*, 11394–11401.
- Eccles, J.C. (1981). The modular operation of the cerebral neocortex considered as the material basis of mental events. *Neuroscience* *6*, 1839–1855.
- Emsley, J.G., and Macklis, J.D. (2006). Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biol.* *2*, 175.
- Eng, L.F., and Ghirnikar, R.S. (1994). GFAP and Astrogliosis. *Brain Pathol.* *4*, 229–237.
- Eng, L.F., Vanderhaeghen, J.J., Bignami, A., and Gerstl, B. (1971). An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.* *28*, 351–354.
- Eng, L.F., Ghirnikar, R.S., and Lee, Y.L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem. Res.* *25*, 1439–1451.
- Eroglu, Ç., Allen, N.J., Susman, M.W., O'Rourke, N.A., Park, C.Y., Özkan, E., Chakraborty, C., Mulinyawe, S.B., Annis, D.S., Huberman, A.D., et al. (2009). Gabapentin Receptor $\alpha 2\delta$ -1 Is a Neuronal Thrombospondin Receptor Responsible for Excitatory CNS Synaptogenesis. *Cell* *139*, 380–392.
- Ertürk, A., Becker, K., Jährling, N., Mauch, C.P., Hojer, C.D., Egen, J.G., Hellal, F., Bradke, F., Sheng, M., and Dodt, H.-U. (2012). Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat. Protoc.* *7*, 1983–1995.
- Espinosa, J.S., and Luo, L. (2008). Timing Neurogenesis and Differentiation: Insights from Quantitative Clonal Analyses of Cerebellar Granule Cells. *J. Neurosci.* *28*, 2301–2312.
- Fan, X., and Agid, Y. (2018). At the Origin of the History of Glia. *Neuroscience* *385*, 255–271.
- Farmer, W.T., and Murai, K. (2017). Resolving Astrocyte Heterogeneity in the CNS. *Front. Cell. Neurosci.* *11*.
- Fawal, M.-A., Jungas, T., Kischel, A., Audouard, C., Iacovoni, J.S., and Davy, A. (2018). Cross Talk between One-Carbon Metabolism, Eph Signaling, and Histone Methylation Promotes Neural Stem Cell Differentiation. *Cell Rep.* *23*, 2864-2873.e7.

- Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D., and Chambon, P. (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 10887–10890.
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., and Chambon, P. (1997). Regulation of Cre Recombinase Activity by Mutated Estrogen Receptor Ligand-Binding Domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *237*, 752–757.
- Feil, S., Valtcheva, N., and Feil, R. (2009). Inducible Cre mice. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *530*, 343–363.
- Feldmeyer, D. (2012). Excitatory neuronal connectivity in the barrel cortex. *Front. Neuroanat.* *6*, 24.
- Feng, G., Mellor, R.H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q.T., Wallace, M., Nerbonne, J.M., Lichtman, J.W., and Sanes, J.R. (2000). Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* *28*, 41–51.
- Feng, L., Hatten, M.E., and Heintz, N. (1994). Brain lipid-binding protein (BLBP): A novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* *12*, 895–908.
- Fernández, M.E., Croce, S., Boutin, C., Cremer, H., and Raineteau, O. (2011). Targeted electroporation of defined lateral ventricular walls: a novel and rapid method to study fate specification during postnatal forebrain neurogenesis. *Neural Develop.* *6*, 13.
- Figueres-Oñate, M., García-Marqués, J., and López-Mascaraque, L. (2016). UbC-StarTrack, a clonal method to target the entire progeny of individual progenitors. *Sci. Rep.* *6*.
- Foo, L.C., and Dougherty, J.D. (2013). Aldh1L1 is expressed by postnatal neural stem cells *in vivo*: *In Vivo* Expression of Aldh1L1 by Neural Stem Cells. *Glia* *61*, 1533–1541.
- Franze, K., Grosche, J., Skatchkov, S.N., Schinkinger, S., Foja, C., Schild, D., Uckermann, O., Travis, K., Reichenbach, A., and Guck, J. (2007). Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 8287–8292.
- Freeman, M.R. (2010). Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science* *330*, 774–778.
- Frotscher, M. (1998). Cajal—Retzius cells, Reelin, and the formation of layers. *Curr. Opin. Neurobiol.* *8*, 570–575.
- Fu, H., Cai, J., Clevers, H., Fast, E., Gray, S., Greenberg, R., Jain, M.K., Ma, Q., Qiu, M., Rowitch, D.H., et al. (2009). A Genome-Wide Screen for Spatially Restricted Expression Patterns Identifies Transcription Factors That Regulate Glial Development. *J. Neurosci.* *29*, 11399–11408.
- Fuentealba, L.C., Rompani, S.B., Parraguez, J.I., Obernier, K., Romero, R., Cepko, C.L., and Alvarez-Buylla, A. (2015). Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell* *161*, 1644–1655.
- Fuente-Martín, E., García-Cáceres, C., Argente-Arizón, P., Díaz, F., Granado, M., Freire-Regatillo, A., Castro-González, D., Ceballos, M.L., Frago, L.M., Dickson, S.L., et al. (2016). Ghrelin Regulates Glucose and Glutamate Transporters in Hypothalamic Astrocytes. *Sci. Rep.* *6*.
- Fukasawa, A., Haba, J., Kageyama, A., Nakazawa, H., and Suyama, M. (2008). High Speed HPD for Photon Counting. *IEEE Trans. Nucl. Sci.* *55*, 758–762.
- Fukuchi-Shimogori, T., and Grove, E.A. (2001). Neocortex Patterning by the Secreted Signaling Molecule FGF8. *Science* *294*, 1071–1074.
- Gao, P., Postiglione, M.P., Krieger, T.G., Hernandez, L., Wang, C., Han, Z., Streicher, C., Papusheva, E., Insolera, R., Chugh, K., et al. (2014). Deterministic Progenitor Behavior and Unitary Production of Neurons in the Neocortex. *Cell* *159*, 775–788.

- García-Cáceres, C., Quarta, C., Varela, L., Gao, Y., Gruber, T., Legutko, B., Jastroch, M., Johansson, P., Ninkovic, J., Yi, C.-X., et al. (2016). Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability. *Cell* *166*, 867–880.
- García-Marín, V., García-López, P., and Freire, M. (2007). Cajal's contributions to glia research. *Trends Neurosci.* *30*, 479–487.
- García-Marqués, J., and López-Mascaraque, L. (2013). Clonal Identity Determines Astrocyte Cortical Heterogeneity. *Cereb. Cortex* *23*, 1463–1472.
- García-Marqués, J., and López-Mascaraque, L. (2017). Clonal Mapping of Astrocytes in the Olfactory Bulb and Rostral Migratory Stream. *Cereb. Cortex* *27*, 2195–2209.
- García-Marqués, J., Nunez-Llaves, R., and Lopez-Mascaraque, L. (2014). NG2-Glia from Pallial Progenitors Produce the Largest Clonal Clusters of the Brain: Time Frame of Clonal Generation in Cortex and Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* *34*, 2305–2313.
- Garcia-Moreno, F., Vasistha, N.A., Begbie, J., and Molnar, Z. (2014). CLoNe is a new method to target single progenitors and study their progeny in mouse and chick. *Development* *141*, 1589–1598.
- Ge, W.-P., and Jia, J.-M. (2016). Local production of astrocytes in the cerebral cortex. *Neuroscience* *323*, 3–9.
- Ge, W.-P., Miyawaki, A., Gage, F.H., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2012). Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex. *Nature* *484*, 376–380.
- Gensert, J.M., and Goldman, J.E. (1996). In vivo characterization of endogenous proliferating cells in adult rat subcortical white matter. *Glia* *17*, 39–51.
- Gensert, J.M., and Goldman, J.E. (2001). Heterogeneity of cycling glial progenitors in the adult mammalian cortex and white matter. *J. Neurobiol.* *48*, 75–86.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* *330*, 841–845.
- Girard, P.P., and Forget, B.C. (2011). Microscopie de fluorescence à feuille de lumière: La face cachée de l'échantillon enfin dévoilée. *Médecine/Sciences* *27*, 753–762.
- Giulian, D., Young, D.G., Woodward, J., Brown, D.C., and Lachman, L.B. (1988). Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *8*, 709–714.
- Goedhart, J., von Stetten, D., Noirclerc-Savoye, M., Lelimosin, M., Joosen, L., Hink, M.A., van Weeren, L., Gadella, T.W.J., and Royant, A. (2012). Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat. Commun.* *3*, 751.
- Goldman, J.E. (1995). Lineage, migration, and fate determination of postnatal subventricular zone cells in the mammalian CNS. *J. Neurooncol.* *24*, 61–64.
- Goldman, J.E. (1997). Developmental origins of astrocytes. In *Glial Cell Development: basic principles and clinical relevance*. Jessen KR, Richardson WD, editors (Oxford University Press).
- Goldman-Rakic, P.. (1995). Cellular basis of working memory. *Neuron* *14*, 477–485.
- Goldman-Rakic, P.S. (1988). Topography of Cognition: Parallel Distributed Networks in Primate Association Cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* *11*, 137–156.
- Goldman-Rakic, P.S. (2011). Circuitry of Primate Prefrontal Cortex and Regulation of Behavior by Representational Memory. In *Comprehensive Physiology*, R. Terjung, ed. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), p.

Golgi, C. (1885). Sulla fina anatomia degli organi centrali del sistema nervoso. Giunti Ed. 268 p.

Gosselin, R.-D., Gibney, S., O'Malley, D., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2009). Region specific decrease in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the brain of a rat model of depression. *Neuroscience* 159, 915–925.

Götz, M., Hartfuss, E., and Malatesta, P. (2002). Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice. *Brain Res. Bull.* 57, 777–788.

Götz, M., Sirko, S., Beckers, J., and Irmeler, M. (2015). Reactive astrocytes as neural stem or progenitor cells: In vivo lineage, In vitro potential, and Genome-wide expression analysis. *Glia* 63, 1452–1468.

Gourine, A.V., Kasymov, V., Marina, N., Tang, F., Figueiredo, M.F., Lane, S., Teschemacher, A.G., Spyer, K.M., Deisseroth, K., and Kasparov, S. (2010). Astrocytes Control Breathing Through pH-Dependent Release of ATP. *Science* 329, 571–575.

Gray, G.E., Glover, J.C., Majors, J., and Sanes, J.R. (1988). Radial arrangement of clonally related cells in the chicken optic tectum: lineage analysis with a recombinant retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 7356–7360.

Gressens, P., Richelme, C., Kadhim, H.J., Gadisseux, J.F., and Evrard, P. (1992). The germinative zone produces the most cortical astrocytes after neuronal migration in the developing mammalian brain. *Biol. Neonate* 61, 4–24.

Grosche, J., Matyash, V., Möller, T., Verkhratsky, A., Reichenbach, A., and Kettenmann, H. (1999). Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat. Neurosci.* 2, 139–143.

Grove, E.A., Williams, B.P., Li, D.Q., Hajihosseini, M., Friedrich, A., and Price, J. (1993). Multiple restricted lineages in the embryonic rat cerebral cortex. *Dev. Camb. Engl.* 117, 553–561.

Guérout, N., Li, X., and Barnabé-Heider, F. (2014). Cell fate control in the developing central nervous system. *Exp. Cell Res.* 321, 77–83.

Guo, Z., Zhang, L., Wu, Z., Chen, Y., Wang, F., and Chen, G. (2014). In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell Stem Cell* 14, 188–202.

Hachem, S., Aguirre, A., Vives, V., Marks, A., Gallo, V., and Legraverend, C. (2005). Spatial and temporal expression of S100B in cells of oligodendrocyte lineage. *Glia* 51, 81–97.

Halassa, M.M., and Haydon, P.G. (2010). Integrated Brain Circuits: Astrocytic Networks Modulate Neuronal Activity and Behavior. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 335–355.

Halassa, M.M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J.-H., and Haydon, P.G. (2007). Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 6473–6477.

Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Ando, R., Shimogori, T., Noda, H., Fukami, K., Sakaue-Sawano, A., and Miyawaki, A. (2011). Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat. Neurosci.* 14, 1481–1488.

Hamilton, N.B., and Attwell, D. (2010). Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 227–238.

Han, X., Chen, M., Wang, F., Windrem, M., Wang, S., Shanz, S., Xu, Q., Oberheim, N.A., Bekar, L., Betstadt, S., et al. (2013). Forebrain Engraftment by Human Glial Progenitor Cells Enhances Synaptic Plasticity and Learning in Adult Mice. *Cell Stem Cell* 12, 342–353.

- Han, Y., Yu, H.-X., Sun, M.-L., Wang, Y., Xi, W., and Yu, Y.-Q. (2014). Astrocyte-restricted disruption of connexin-43 impairs neuronal plasticity in mouse barrel cortex. *Eur. J. Neurosci.* *39*, 35–45.
- Harris, K.D., and Shepherd, G.M.G. (2015). The neocortical circuit: themes and variations. *Nat. Neurosci.* *18*, 170–181.
- Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N., and Götz, M. (2001). Characterization of CNS Precursor Subtypes and Radial Glia. *Dev. Biol.* *229*, 15–30.
- Harwell, C.C., Fuentealba, L.C., Gonzalez-Cerrillo, A., Parker, P.R.L., Gertz, C.C., Mazzola, E., Garcia, M.T., Alvarez-Buylla, A., Cepko, C.L., and Kriegstein, A.R. (2015). Wide Dispersion and Diversity of Clonally Related Inhibitory Interneurons. *Neuron* *87*, 999–1007.
- Hashimoto-Torii, K., Torii, M., Sarkisian, M.R., Bartley, C.M., Shen, J., Radtke, F., Gridley, T., Sestan, N., and Rakic, P. (2008). Interaction between Reelin and Notch signaling regulates neuronal migration in the cerebral cortex. *Neuron* *60*, 273–284.
- Hatten, M.E. (1999). CENTRAL NERVOUS SYSTEM NEURONAL MIGRATION. *Annu. Rev. Neurosci.* *22*, 511–539.
- Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., and Huttner, W.B. (2004). From The Cover: Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: A major site of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 3196–3201.
- Haydon, P.G., and Parpura, V. (2009). *Astrocytes in (Patho)Physiology of the Nervous System* (Boston, MA: Springer US).
- He, F., Ge, W., Martinowich, K., Becker-Catania, S., Coskun, V., Zhu, W., Wu, H., Castro, D., Guillemot, F., Fan, G., et al. (2005). A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astrogliogenesis. *Nat. Neurosci.* *8*, 616.
- Herculano-Houzel, S. (2014). The glia/neuron ratio: How it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution: The Glia/Neuron Ratio. *Glia* *62*, 1377–1391.
- Hewett, J.A. (2009). Determinants of regional and local diversity within the astroglial lineage of the normal central nervous system. *J. Neurochem.* *110*, 1717–1736.
- Himanen, J.-P., and Nikolov, D.B. (2003). Eph signaling: a structural view. *Trends Neurosci.* *26*, 46–51.
- Himanen, J.-P., Saha, N., and Nikolov, D.B. (2007). Cell-cell signaling via Eph receptors and ephrins. *Curr. Opin. Cell Biol.* *19*, 534–542.
- Hippenmeyer, S., Youn, Y.H., Moon, H.M., Miyamichi, K., Zong, H., Wynshaw-Boris, A., and Luo, L. (2010). Genetic mosaic dissection of *Lis1* and *Ndel1* in neuronal migration. *Neuron* *68*, 695–709.
- Hippenmeyer, S., Johnson, R.L., and Luo, L. (2013). Mosaic analysis with double markers reveals cell-type-specific paternal growth dominance. *Cell Rep.* *3*, 960–967.
- His, W. (1874). *Unsere Körperform und das physiologische Problem ihrer Entstehung: Briefe an einen befreundeten Naturforscher.* (Leipzig), p.
- His, W. (1889). Die neuroblasten und deren entstehung im embryonalen mark. *Arch Anat Physiol Anat Abt* 251–300.
- His, W. (1904). *Die Entwicklung des menschlichen Gehirns während der ersten Monate.* (Leipzig), p.
- Hitoshi, N., Ken-ichi, Y., and Jun-ichi, M. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* *108*, 193–199.

- Hochstim, C., Deneen, B., Lukaszewicz, A., Zhou, Q., and Anderson, D.J. (2008). Identification of Positionally Distinct Astrocyte Subtypes whose Identities Are Specified by a Homeodomain Code. *Cell* 133, 510–522.
- Hoess, R., Abremski, K., and Sternberg, N. (1984). The nature of the interaction of the P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 49, 761–768.
- Hong, S.E., Shugart, Y.Y., Huang, D.T., Shahwan, S.A., Grant, P.E., Hourihane, J.O., Martin, N.D.T., and Walsh, C.A. (2000). Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nat. Genet.* 26, 93–96.
- Hosoya, T., Takizawa, K., Nitta, K., and Hotta, Y. (1995). Glial cells missing: A binary switch between neuronal and glial determination in drosophila. *Cell* 82, 1025–1036.
- Huang, Z. (2009). Molecular regulation of neuronal migration during neocortical development. *Mol. Cell. Neurosci.* 42, 11–22.
- Huang, W., Zhao, N., Bai, X., Karram, K., Trotter, J., Goebbels, S., Scheller, A., and Kirchhoff, F. (2014). Novel NG2-CreERT2 knock-in mice demonstrate heterogeneous differentiation potential of NG2 glia during development. *Glia* 62, 896–913.
- Hubel, D.H., and Wiesel, T.N. (1969). Anatomical Demonstration of Columns in the Monkey Striate Cortex. *Nature* 221, 747–750.
- Huisken, J. (2004). Optical Sectioning Deep Inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy. *Science* 305, 1007–1009.
- Huisken, J., and Stainier, D.Y.R. (2007). Even fluorescence excitation by multidirectional selective plane illumination microscopy (mSPIM). *Opt. Lett.* 32, 2608.
- Huttenlocher, P.R. (1990). Morphometric study of human cerebral cortex development. *Neuropsychologia* 28, 517–527.
- Ichikawa, M., Shiga, T., and Hirata, Y. (1983). Spatial and temporal pattern of postnatal proliferation of glial cells in the parietal cortex of the rat. *Dev. Brain Res.* 9, 181–187.
- Ihrie, R.A., and Alvarez-Buylla, A. (2008). Cells in the astroglial lineage are neural stem cells. *Cell Tissue Res.* 331, 179–191.
- Imai, F., Hirai, S., Akimoto, K., Koyama, H., Miyata, T., Ogawa, M., Noguchi, S., Sasaoka, T., Noda, T., and Ohno, S. (2006). Inactivation of aPKC results in the loss of adherens junctions in neuroepithelial cells without affecting neurogenesis in mouse neocortex. *Development* 133, 1735–1744.
- Imayoshi, I., Ohtsuka, T., Metzger, D., Chambon, P., and Kageyama, R. (2006). Temporal regulation of Cre recombinase activity in neural stem cells. *Genesis* 44, 233–238.
- Imura, T., Nakano, I., Kornblum, H.I., and Sofroniew, M.V. (2006). Phenotypic and functional heterogeneity of GFAP-expressing cells in vitro: differential expression of LeX/CD15 by GFAP-expressing multipotent neural stem cells and non-neurogenic astrocytes. *Glia* 53, 277–293.
- Jacobs, S., and Doering, L.C. (2010). Astrocytes Prevent Abnormal Neuronal Development in the Fragile X Mouse. *J. Neurosci.* 30, 4508–4514.
- Jessell, T.M. (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat. Rev. Genet.* 1, 20–29.
- Jones, B.W., Fetter, R.D., Tear, G., and Goodman, C.S. (1995). glial cells missing: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate. *Cell* 82, 1013–1023.

- Jun-ichi, M., Satoshi, T., Kimi, A., Fumi, T., Akira, T., Kiyoshi, T., and Ken-ichi, Y. (1989). Expression vector system based on the chicken β -actin promoter directs efficient production of interleukin-5. *Gene* 79, 269–277.
- Kakita, A., and Goldman, J.E. (1999). Patterns and dynamics of SVZ cell migration in the postnatal forebrain: monitoring living progenitors in slice preparations. *Neuron* 23, 461–472.
- Kakita, A., Zerlin, M., Takahashi, H., and Goldman, J.E. (2003). Some glial progenitors in the neonatal subventricular zone migrate through the corpus callosum to the contralateral cerebral hemisphere. *J. Comp. Neurol.* 458, 381–388.
- Kálmán, M., and Ajtai, B.M. (2001). A comparison of intermediate filament markers for presumptive astroglia in the developing rat neocortex: immunostaining against nestin reveals more detail, than GFAP or vimentin. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 19, 101–108.
- Kammerer, M., Pirola, B., Giglio, S., and Giangrande, A. (1999). GCMB, a second human homolog of the fly *glide/gcm* gene. *Cytogenet. Genome Res.* 84, 43–47.
- Kanemura, Y., Hiraga, S., Arita, N., Ohnishi, T., Izumoto, S., Mori, K., Matsumura, H., Yamasaki, M., Fushiki, S., and Yoshimine, T. (1999). Isolation and expression analysis of a novel human homologue of the *Drosophila glial cells missing* (*gcm*) gene. *FEBS Lett.* 442, 151–156.
- Karschin, A., Wässle, H., and Schnitzer, J. (1986). Shape and distribution of astrocytes in the cat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 27, 828–831.
- Kawakami, K. (2007). Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biol.* 8, S7.
- Kawakami, K., and Noda, T. (2004). Transposition of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish *Oryzias latipes*, in mouse embryonic stem cells. *Genetics* 166, 895–899.
- Ke, M.-T., and Imai, T. (2014). Optical clearing of fixed brain samples using SeeDB. *Curr. Protoc. Neurosci.* 66, Unit 2.22.
- Ke, M.-T., Fujimoto, S., and Imai, T. (2013). SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat. Neurosci.* 16, 1154–1161.
- Kennedy, M. (1995). Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains. *Trends Biochem. Sci.* 20, 350.
- Keshavarz, M. (2017). Glial cells as key elements in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Acta Neuropsychiatr.* 29, 140–152.
- Kessarlis, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M., and Richardson, W.D. (2006). Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat. Neurosci.* 9, 173–179.
- Kettenmann, H., and Verkhratsky, A. (2008). Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci.* 31, 653–659.
- Khakh, B.S., and Sofroniew, M.V. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat. Neurosci.* 18, 942–952.
- Kim, J., Jones, B.W., Zock, C., Chen, Z., Wang, H., Goodman, C.S., and Anderson, D.J. (1998). Isolation and characterization of mammalian homologs of the *Drosophila* gene *glial cells missing*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 12364–12369.
- Kim, J.G., Suyama, S., Koch, M., Jin, S., Argente-Arizon, P., Argente, J., Liu, Z.-W., Zimmer, M.R., Jeong, J.K., Sziget-Buck, K., et al. (2014). Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. *Nat. Neurosci.* 17, 908–910.

- Kimelberg, H.K., and Nedergaard, M. (2010). Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics* 7, 338–353.
- Kimmel, C.B., Warga, R.M., and Schilling, T.F. (1990). Origin and organization of the zebrafish fate map. *Dev. Camb. Engl.* 108, 581–594.
- Konno, D., Shioi, G., Shitamukai, A., Mori, A., Kiyonari, H., Miyata, T., and Matsuzaki, F. (2008). Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nat. Cell Biol.* 10, 93–101.
- Kosaka, T., and Hama, K. (1986). Three-dimensional structure of astrocytes in the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 249, 242–260.
- Kretschmar, K., and Watt, F.M. (2012). Lineage Tracing. *Cell* 148, 33–45.
- Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 149–184.
- Kucukdereli, H., Allen, N.J., Lee, A.T., Feng, A., Ozlu, M.I., Conatser, L.M., Chakraborty, C., Workman, G., Weaver, M., Sage, E.H., et al. (2011). Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, E440–E449.
- Kulkarni, P.M., Barton, E., Savelonas, M., Padmanabhan, R., Lu, Y., Trett, K., Shain, W., Leasure, J.L., and Roysam, B. (2015). Quantitative 3-D analysis of GFAP labeled astrocytes from fluorescence confocal images. *J. Neurosci. Methods* 246, 38–51.
- Kuo, C.T., Mirzadeh, Z., Soriano-Navarro, M., Rašin, M., Wang, D., Shen, J., Šestan, N., Garcia-Verdugo, J., Alvarez-Buylla, A., Jan, L.Y., et al. (2006). Postnatal Deletion of Numb/Numbl-like Reveals Repair and Remodeling Capacity in the Subventricular Neurogenic Niche. *Cell* 127, 1253–1264.
- Kwan, K.Y., Sestan, N., and Anton, E.S. (2012). Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development* 139, 1535–1546.
- Lacoste, A., Berenshteyn, F., and Brivanlou, A.H. (2009). An Efficient and Reversible Transposable System for Gene Delivery and Lineage-Specific Differentiation in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 5, 332–342.
- Lagace, D.C., Whitman, M.C., Noonan, M.A., Ables, J.L., DeCarolis, N.A., Arguello, A.A., Donovan, M.H., Fischer, S.J., Farnbauch, L.A., Beech, R.D., et al. (2007). Dynamic Contribution of Nestin-Expressing Stem Cells to Adult Neurogenesis. *J. Neurosci.* 27, 12623–12629.
- Laguesse, S., Peyre, E., and Nguyen, L. (2015). Progenitor genealogy in the developing cerebral cortex. *Cell Tissue Res.* 359, 17–32.
- Lambert de Rouvroit, C., and Goffinet, A.M. (1998). *The Reeler Mouse as a Model of Brain Development* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).
- Lange, S.C., Bak, L.K., Waagepetersen, H.S., Schousboe, A., and Norenberg, M.D. (2012). Primary cultures of astrocytes: their value in understanding astrocytes in health and disease. *Neurochem. Res.* 37, 2569–2588.
- Lanjakornsiripan, D., Pior, B.-J., Kawaguchi, D., Furutachi, S., Tahara, T., Katsuyama, Y., Suzuki, Y., Fukazawa, Y., and Gotoh, Y. (2018). Layer-specific morphological and molecular differences in neocortical astrocytes and their dependence on neuronal layers. *Nat. Commun.* 9, 1623.
- Lansford, R., Bearman, G., and Fraser, S.E. (2001). Resolution of multiple green fluorescent protein color variants and dyes using two-photon microscopy and imaging spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* 6, 311.

- Larriva-Sahd, J.A. (2014). Some predictions of Rafael Lorente de N³ 80 years later. *Front. Neuroanat.* *8*.
- Lee, J.E., Hollenberg, S.M., Snider, L., Turner, D.L., Lipnick, N., and Weintraub, H. (1995). Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* *268*, 836–844.
- Lee, Y., Messing, A., Su, M., and Brenner, M. (2008). GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia* *56*, 481–493.
- Lemon, W.C., and Keller, P.J. (2015). Live imaging of nervous system development and function using light-sheet microscopy. *Mol. Reprod. Dev.* *82*, 605–618.
- von Lenhossék, M. (1891). Zur Kenntnis der Neuroglia des menschlichen Rückenmarks. *Verrhandl Anat Gessels.*
- von Lenhossék, M. (1893). *Der feinere Bau des Nervensystems in Lichte neuester Forschung.* Fisch. Med. Buchhandlung H Kornfeld *Berlin*.
- Levison, S.W., and Goldman, J.E. (1993). Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron* *10*, 201–212.
- Levison, S.W., Young, G.M., and Goldman, J.E. (1999). Cycling cells in the adult rat neocortex preferentially generate oligodendroglia. *J. Neurosci. Res.* *57*, 435–446.
- Levitt, P., and Rakic, P. (1980). Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J. Comp. Neurol.* *193*, 815–840.
- Lewis, P.D. (1968). The fate of the subependymal cell in the adult rat brain, with a note on the origin of microglia. *Brain J. Neurol.* *91*, 721–736.
- Li, X., Erclik, T., Bertet, C., Chen, Z., Voutev, R., Venkatesh, S., Morante, J., Celik, A., and Desplan, C. (2013). Temporal patterning of *Drosophila* medulla neuroblasts controls neural fates. *Nature* *498*, 456.
- Liauw, J., Hoang, S., Choi, M., Eroglu, C., Choi, M., Sun, G., Percy, M., Wildman-Tobriner, B., Bliss, T., Guzman, R.G., et al. (2008). Thrombospondins 1 and 2 are Necessary for Synaptic Plasticity and Functional Recovery after Stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *28*, 1722–1732.
- Ligon, K.L., Huillard, E., Mehta, S., Kesari, S., Liu, H., Alberta, J.A., Bachoo, R.M., Kane, M., Louis, D.N., Depinho, R.A., et al. (2007). Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. *Neuron* *53*, 503–517.
- Liu, C., Sage, J.C., Miller, M.R., Verhaak, R.G.W., Hippenmeyer, S., Vogel, H., Foreman, O., Bronson, R.T., Nishiyama, A., Luo, L., et al. (2011). Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. *Cell* *146*, 209–221.
- Liu, Y., Wu, Y., Lee, J.C., Xue, H., Pevny, L.H., Kaprielian, Z., and Rao, M.S. (2002). Oligodendrocyte and astrocyte development in rodents: an in situ and immunohistological analysis during embryonic development. *Glia* *40*, 25–43.
- Livet, J., Weissman, T.A., Kang, H., Draft, R.W., Lu, J., Bennis, R.A., Sanes, J.R., and Lichtman, J.W. (2007). Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* *450*, 56–62.
- López-Hidalgo, M., and Schummers, J. (2014). Cortical maps: a role for astrocytes? *Curr. Opin. Neurobiol.* *24*, 176–189.
- López-Hidalgo, M., Hoover, W.B., and Schummers, J. (2016). Spatial organization of astrocytes in ferret visual cortex. *J. Comp. Neurol.* *524*, 3561–3576.

- Lorente de Nó, R. (1938). The cerebral cortex: architecture, intracortical connections and motor projections. In *Physiology of the Nervous System*, (London: J.F. Fulton), p.
- LoTurco, J.J., and Bai, J. (2006). The multipolar stage and disruptions in neuronal migration. *Trends Neurosci.* *29*, 407–413.
- LoTurco, J., Manent, J.-B., and Sidiqi, F. (2009). New and Improved Tools for In Utero Electroporation Studies of Developing Cerebral Cortex. *Cereb. Cortex* *19*, 120–125.
- Loulier, K., Barry, R., Mahou, P., Le Franc, Y., Supatto, W., Matho, K.S., Ieng, S., Fouquet, S., Dupin, E., Benosman, R., et al. (2014). Multiplex Cell and Lineage Tracking with Combinatorial Labels. *Neuron* *81*, 505–520.
- Lugaro, E. (1907). Sulle funzioni della nevroglia. *Riv Patol Nerv Ment* 225–233.
- Luhmann, H.J., Fukuda, A., and Kilb, W. (2015). Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. *Front. Cell. Neurosci.* *9*.
- Luo, L., and O’Leary, D.D.M. (2005). Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annu. Rev. Neurosci.* *28*, 127–156.
- Luskin, M.B. (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* *11*, 173–189.
- Luskin, M.B., and McDermott, K. (1994). Divergent lineages for oligodendrocytes and astrocytes originating in the neonatal forebrain subventricular zone. *Glia* *11*, 211–226.
- Luskin, M.B., Pearlman, A.L., and Sanes, J.R. (1988). Cell lineage in the cerebral cortex of the mouse studied in vivo and in vitro with a Recombinant Retrovirus. *Neuron* *1*, 635–647.
- Madisen, L., Zwingman, T.A., Sunkin, S.M., Oh, S.W., Zariwala, H.A., Gu, H., Ng, L.L., Palmiter, R.D., Hawrylycz, M.J., Jones, A.R., et al. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat. Neurosci.* *13*, 133–140.
- Magavi, S., Friedmann, D., Banks, G., Stolfi, A., and Lois, C. (2012). Coincident Generation of Pyramidal Neurons and Protoplasmic Astrocytes in Neocortical Columns. *J. Neurosci.* *32*, 4762–4772.
- Magnus, T., Coksaygan, T., Korn, T., Xue, H., Arumugam, T.V., Mughal, M.R., Eckley, D.M., Tang, S.-C., DeTolla, L., Rao, M.S., et al. (2007). Evidence that nucleocytoplasmic Olig2 translocation mediates brain-injury-induced differentiation of glial precursors to astrocytes. *J. Neurosci. Res.* *85*, 2126–2137.
- Mahou, P., Zimmerley, M., Loulier, K., Matho, K.S., Labroille, G., Morin, X., Supatto, W., Livet, J., Débarre, D., and Beaurepaire, E. (2012). Multicolor two-photon tissue imaging by wavelength mixing. *Nat. Methods* *9*, 815–818.
- Mahou, P., Vermot, J., Beaurepaire, E., and Supatto, W. (2014). Multicolor two-photon light-sheet microscopy. *Nat. Methods* *11*, 600–601.
- Malatesta, P., Hartfuss, E., and Götz, M. (2000). Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* *11*.
- Malatesta, P., Hack, M.A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F., and Götz, M. (2003). Neuronal or Glial Progeny. *Neuron* *37*, 751–764.
- Mares, V., and Bruckner, G. (1978). Postnatal formation of non-neuronal cells in the rat occipital cerebrum: an autoradiographic study of the time and space pattern of cell division. *J. Comp. Neurol.* *177*, 519–528.
- Marín, O., and Rubenstein, J.L.R. (2003). Cell migration in the forebrain. *Annu. Rev. Neurosci.* *26*, 441–483.

- Marín, O., and Tsai, L.-H. (2010). Guiding Neuronal Cell Migrations. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*.
- Marín-padilla, M. (1995). Prenatal development of fibrous (white matter), protoplasmic (gray matter), and layer I astrocytes in the human cerebral cortex: A Golgi study. *J. Comp. Neurol.* *357*, 554–572.
- Marín-Padilla, M. (2014). The mammalian neocortex new pyramidal neuron: a new conception. *Front. Neuroanat.* *7*, 51.
- Marshall, C.A.G., and Goldman, J.E. (2002). Subpallial dlx2-expressing cells give rise to astrocytes and oligodendrocytes in the cerebral cortex and white matter. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 9821–9830.
- Marshall, C.A.G., Suzuki, S.O., and Goldman, J.E. (2003). Gliogenic and neurogenic progenitors of the subventricular zone: Who are they, where did they come from, and where are they going? *Glia* *43*, 52–61.
- Marshall, C.A.G., Novitch, B.G., and Goldman, J.E. (2005). Olig2 Directs Astrocyte and Oligodendrocyte Formation in Postnatal Subventricular Zone Cells. *J. Neurosci.* *25*, 7289–7298.
- Martín-López, E., García-Marques, J., Núñez-Llaves, R., and López-Mascaraque, L. (2013). Clonal Astrocytic Response to Cortical Injury. *PLoS ONE* *8*, e74039.
- Matyash, V., and Kettenmann, H. (2010). Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res. Rev.* *63*, 2–10.
- Mayer, C., Jaglin, X.H., Cobbs, L.V., Bandler, R.C., Streicher, C., Cepko, C.L., Hippenmeyer, S., and Fishell, G. (2015). Clonally Related Forebrain Interneurons Disperse Broadly across Both Functional Areas and Structural Boundaries. *Neuron* *87*, 989–998.
- McCarthy, M., Turnbull, D.H., Walsh, C.A., and Fishell, G. (2001). Telencephalic neural progenitors appear to be restricted to regional and glial fates before the onset of neurogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 6772–6781.
- McKenna, A., Findlay, G.M., Gagnon, J.A., Horwitz, M.S., Schier, A.F., and Shendure, J. (2016). Whole-organism lineage tracing by combinatorial and cumulative genome editing. *Science* *353*, aaf7907.
- Meacham, C.E., and Morrison, S.J. (2013). Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* *501*, 328–337.
- Merkle, F.T., Tramontin, A.D., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2004). Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 17528–17532.
- Meyer-Franke, A., Shen, S., and Barres, B.A. (1999). Astrocytes Induce Oligodendrocyte Processes to Align with and Adhere to Axons. *Mol. Cell. Neurosci.* *14*, 385–397.
- Mich, J.K., Signer, R.A., Nakada, D., Pineda, A., Burgess, R.J., Vue, T.Y., Johnson, J.E., and Morrison, S.J. (2014). Prospective identification of functionally distinct stem cells and neurosphere-initiating cells in adult mouse forebrain. *ELife* *3*, e02669.
- Miller, R., and Raff, M. (1984). Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *J. Neurosci.* *4*, 585–592.
- Misson, J.-P., Takahashi, T., and Caviness, V.S. (1991). Ontogeny of radial and other astroglial cells in murine cerebral cortex. *Glia* *4*, 138–148.

- Miyata, T. (2007). Development of three-dimensional architecture of the neuroepithelium: Role of pseudostratification and cellular 'community': Pseudostratification in neuroepithelium. *Dev. Growth Differ.* *50*, S105–S112.
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H., and Ogawa, M. (2001). Asymmetric Inheritance of Radial Glial Fibers by Cortical Neurons. *Neuron* *31*, 727–741.
- Molofsky, A.V., and Deneen, B. (2015). Astrocyte development: A Guide for the Perplexed: Mechanisms of Astrocyte development. *Glia* *63*, 1320–1329.
- Molofsky, A.V., Krennick, R., Ullian, E., Tsai, H.-h., Deneen, B., Richardson, W.D., Barres, B.A., and Rowitch, D.H. (2012). Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev.* *26*, 891–907.
- Molofsky, A.V., Glasgow, S.M., Chaboub, L.S., Tsai, H.-H., Murnen, A.T., Kelley, K.W., Fancy, S.P.J., Yuen, T.J., Madireddy, L., Baranzini, S., et al. (2013). Expression profiling of Aldh111-precursors in the developing spinal cord reveals glial lineage-specific genes and direct Sox9-Nfe211 interactions: Expression Profiling of Astrocyte Precursors. *Glia* *61*, 1518–1532.
- Molofsky, A.V., Kelley, K.W., Tsai, H.-H., Redmond, S.A., Chang, S.M., Madireddy, L., Chan, J.R., Baranzini, S.E., Ullian, E.M., and Rowitch, D.H. (2014). Astrocyte-encoded positional cues maintain sensorimotor circuit integrity. *Nature* *509*, 189–194.
- Morest, D.K. (1970). A study of neurogenesis in the forebrain of opossum pouch young. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* *130*, 265–305.
- Mori, S., and Leblond, C.P. (1969). Electron microscopic features and proliferation of astrocytes in the corpus callosum of the rat. *J. Comp. Neurol.* *137*, 197–225.
- Mori, T., Buffo, A., and Götz, M. (2005). The Novel Roles of Glial Cells Revisited: The Contribution of Radial Glia and Astrocytes to Neurogenesis. In *Current Topics in Developmental Biology*, (Elsevier), pp. 67–99.
- Moroni, R.F., Deleo, F., Regondi, M.C., Madaschi, L., Amadeo, A., and Frassoni, C. (2018). Proliferative cells in the rat developing neocortical grey matter: new insights into gliogenesis. *Brain Struct. Funct.*
- Mountcastle, V. (1997). The columnar organization of the neocortex. *Brain* *120*, 701–722.
- Mountcastle, V.B., Davies, P.W., and Berman, A.L. (1957). Response properties of neurons of cat's somatic sensory cortex to peripheral stimuli. *J. Neurophysiol.* *20*, 374–407.
- Murai, K.K., and Pasquale, E.B. (2011). Eph receptors and ephrins in neuron-astrocyte communication at synapses. *Glia* *59*, 1567–1578.
- Muroyama, Y., Fujiwara, Y., Orkin, S.H., and Rowitch, D.H. (2005). Specification of astrocytes by bHLH protein SCL in a restricted region of the neural tube. *Nature* *438*, 360–363.
- Murray, E., Cho, J.H., Goodwin, D., Ku, T., Swaney, J., Kim, S.-Y., Choi, H., Park, Y.-G., Park, J.-Y., Hubbert, A., et al. (2015). Simple, Scalable Proteomic Imaging for High-Dimensional Profiling of Intact Systems. *Cell* *163*, 1500–1514.
- Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., and Luo, L. (2007). A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* *45*, 593–605.
- Nadarajah, B., and Parnavelas, J.G. (2002). Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* *3*, 423–432.
- Nait-Oumesmar, B., Copperman, A.B., and Lazzarini, R.A. (2000). Placental Expression and Chromosomal Localization of the Human *Gcm 1* Gene. *J. Histochem. Cytochem.* *48*, 915–922.

- Nakanishi, M., Niidome, T., Matsuda, S., Akaike, A., Kihara, T., and Sugimoto, H. (2007). Microglia-derived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells. *Eur. J. Neurosci.* *25*, 649–658.
- Namihira, M., Kohyama, J., Semi, K., Sanosaka, T., Deneen, B., Taga, T., and Nakashima, K. (2009). Committed Neuronal Precursors Confer Astrocytic Potential on Residual Neural Precursor Cells. *Dev. Cell* *16*, 245–255.
- Nedergaard, M., Ransom, B., and Goldman, S.A. (2003). New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* *26*, 523–530.
- Nikolakopoulou, A.M., Koeppen, J., Garcia, M., Leish, J., Obenaus, A., and Ethell, I.M. (2016). Astrocytic Ephrin-B1 Regulates Synapse Remodeling Following Traumatic Brain Injury. *ASN Neuro* *8*, 175909141663022.
- Ninkovic, J., and Götz, M. (2018). Understanding direct neuronal reprogramming — from pioneer factors to 3D chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *52*, 65–69.
- Nishiyama, A., Watanabe, M., Yang, Z., and Bu, J. (2002). Identity, distribution, and development of polydendrocytes: NG2-expressing glial cells. *J. Neurocytol.* *31*, 437–455.
- Nishiyama, A., Suzuki, R., and Zhu, X. (2014). NG2 cells (polydendrocytes) in brain physiology and repair. *Front. Neurosci.* *8*, 133.
- Niu, W., Zang, T., Zou, Y., Fang, S., Smith, D.K., Bachoo, R., and Zhang, C.-L. (2013). In vivo reprogramming of astrocytes to neuroblasts in the adult brain. *Nat. Cell Biol.* *15*, 1164.
- Nixdorf-Bergweiler, B.E., Albrecht, D., and Heinemann, U. (1994). Developmental changes in the number, size, and orientation of GFAP-positive cells in the CA1 region of rat hippocampus. *Glia* *12*, 180–195.
- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Dammerman, R.S., and Kriegstein, A.R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* *409*, 714–720.
- Noctor, S.C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., and Kriegstein, A.R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.* *7*, 136–144.
- Noctor, S.C., Martínez-Cerdeño, V., and Kriegstein, A.R. (2007). Contribution of Intermediate Progenitor Cells to Cortical Histogenesis. *Arch. Neurol.* *64*, 639.
- Noctor, S.C., Martínez-Cerdeño, V., and Kriegstein, A.R. (2008). Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* *508*, 28–44.
- Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, T., Schipke, C.G., Ohlemeyer, C., Hanisch, U.-K., Kirchhoff, F., and Kettenmann, H. (2001). GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: A tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* *33*, 72–86.
- Nystul, T., and Spradling, A. (2007). An Epithelial Niche in the *Drosophila* Ovary Undergoes Long-Range Stem Cell Replacement. *Cell Stem Cell* *1*, 277–285.
- Oberheim, N.A., Wang, X., Goldman, S., and Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci.* *29*, 547–553.
- Oberheim, N.A., Tian, G.-F., Han, X., Peng, W., Takano, T., Ransom, B., and Nedergaard, M. (2008). Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 3264–3276.

- Oberheim, N.A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J.H.C., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J.D., Pilcher, W., Ojemann, J.G., et al. (2009). Uniquely Hominid Features of Adult Human Astrocytes. *J. Neurosci.* *29*, 3276–3287.
- Oberheim, N.A., Goldman, S.A., and Nedergaard, M. (2012). Heterogeneity of Astrocytic Form and Function. In *Astrocytes*, R. Milner, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 23–45.
- Ogata, K., and Kosaka, T. (2002). Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience* *113*, 221–233.
- Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T., and Nishimune, Y. (1997). ‘Green mice’ as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* *407*, 313–319.
- Okada, S., Nakamura, M., Katoh, H., Miyao, T., Shimazaki, T., Ishii, K., Yamane, J., Yoshimura, A., Iwamoto, Y., Toyama, Y., et al. (2006). Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat. Med.* *12*, 829–834.
- Olabarria, M., and Goldman, J.E. (2017). Disorders of Astrocytes: Alexander Disease as a Model. *Annu. Rev. Pathol.* *12*, 131–152.
- Ono, K., Takebayashi, H., Ikeda, K., Furusho, M., Nishizawa, T., Watanabe, K., and Ikenaka, K. (2008). Regional- and temporal-dependent changes in the differentiation of Olig2 progenitors in the forebrain, and the impact on astrocyte development in the dorsal pallium. *Dev. Biol.* *320*, 456–468.
- Onteniente, B., Kimura, H., and Maeda, T. (1983). Comparative study of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates by PAP immunohistochemistry. *J. Comp. Neurol.* *215*, 427–436.
- Ostrom, Q.T., Bauchet, L., Davis, F.G., Deltour, I., Fisher, J.L., Langer, C.E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J.A., Turner, M.C., Walsh, K.M., et al. (2014). The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro-Oncol.* *16*, 896–913.
- Owada, Y. (2008). Fatty Acid Binding Protein: Localization and Functional Significance in the Brain. *Tohoku J. Exp. Med.* *214*, 213–220.
- Owada, Y., Yoshimoto, T., and Kondo, H. (1996). Spatio-temporally differential expression of genes for three members of fatty acid binding proteins in developing and mature rat brains. *J. Chem. Neuroanat.* *12*, 113–122.
- Pan, C., Cai, R., Quacquarelli, F.P., Ghasemigharagoz, A., Loubopoulos, A., Matryba, P., Plesnila, N., Dichgans, M., Hellal, F., and Ertürk, A. (2016). Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nat. Methods* *13*, 859.
- Panatier, A., Vallée, J., Haber, M., Murai, K.K., Lacaille, J.-C., and Robitaille, R. (2011). Astrocytes Are Endogenous Regulators of Basal Transmission at Central Synapses. *Cell* *146*, 785–798.
- Paredes, I., Himmels, P., and Ruiz de Almodóvar, C. (2018). Neurovascular Communication during CNS Development. *Dev. Cell* *45*, 10–32.
- Parmigiani, E., Leto, K., Rolando, C., Figueres-Onate, M., Lopez-Mascaraque, L., Buffo, A., and Rossi, F. (2015). Heterogeneity and Bipotency of Astroglial-Like Cerebellar Progenitors along the Interneuron and Glial Lineages. *J. Neurosci.* *35*, 7388–7402.
- Parnavelas, J.G. (1999). Glial Cell Lineages in the Rat Cerebral Cortex. *Exp. Neurol.* *156*, 418–429.
- Pasquale, E.B. (2010). Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 165–180.
- Patan, S. (2000). Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J. Neurooncol.* *50*, 1–15.

- Pawley, J.B. (2006). *Handbook Of Biological Confocal Microscopy* (Boston, MA: Springer US).
- Peng, H., Bria, A., Zhou, Z., Iannello, G., and Long, F. (2014). Extensible visualization and analysis for multidimensional images using Vaa3D. *Nat. Protoc.* *9*, 193–208.
- Perea, G., Navarrete, M., and Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* *32*, 421–431.
- Peters, A. (2004). A fourth type of neuroglial cell in the adult central nervous system. *J. Neurocytol.* *33*, 345–357.
- Peters, A., Palay, S.L., and Webster, H. deF (1991). *The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells* (New York Oxford: Oxford University Press).
- Pfrieger, F.W. (2009). Roles of glial cells in synapse development. *Cell. Mol. Life Sci.* *66*, 2037–2047.
- Pfrieger, F.W., and Barres, B.A. (1997). Synaptic Efficacy Enhanced by Glial Cells in Vitro. *Science* *277*, 1684–1687.
- Pixley, S.K.R., and de Vellis, J. (1984). Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Dev. Brain Res.* *15*, 201–209.
- Placone, A.L., Quiñones-Hinojosa, A., and Searson, P.C. (2016). The role of astrocytes in the progression of brain cancer: complicating the picture of the tumor microenvironment. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *37*, 61–69.
- Preibisch, S., Saalfeld, S., and Tomancak, P. (2009). Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics* *25*, 1463–1465.
- Price, J., and Thurlow, L. (1988). Cell lineage in the rat cerebral cortex: a study using retroviral-mediated gene transfer. *Dev. Camb. Engl.* *104*, 473–482.
- Price, J., Turner, D., and Cepko, C. (1987). Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 156–160.
- Pringle, N.P., Yu, W.-P., Howell, M., Colvin, J.S., Ornitz, D.M., and Richardson, W.D. (2003). Fgfr3 expression by astrocytes and their precursors: evidence that astrocytes and oligodendrocytes originate in distinct neuroepithelial domains. *Development* *130*, 93–102.
- Puelles, L., and Rubenstein, J.L.R. (2003). Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci.* *26*, 469–476.
- Puelles, L., Kuwana, E., Puelles, E., Bulfone, A., Shimamura, K., Keleher, J., Smiga, S., and Rubenstein, J.L.R. (2000). Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *J. Comp. Neurol.* *424*, 409–438.
- Qian, X., Shen, Q., Goderie, S.K., He, W., Capela, A., Davis, A.A., and Temple, S. (2000). Timing of CNS Cell Generation: A Programmed Sequence of Neuron and Glial Cell Production from Isolated Murine Cortical Stem Cells. *Neuron* *28*, 69–80.
- Quinlan, R.A., Brenner, M., Goldman, J.E., and Messing, A. (2007). GFAP and its role in Alexander disease. *Exp. Cell Res.* *313*, 2077–2087.
- Ragan, T., Kadiri, L.R., Venkataraju, K.U., Bahlmann, K., Sutin, J., Taranda, J., Arganda-Carreras, I., Kim, Y., Seung, H.S., and Osten, P. (2012). Serial two-photon tomography for automated ex vivo mouse brain imaging. *Nat. Methods* *9*, 255–258.

- Rakic, P. (1968). Studies on the proliferation, migration, and differentiation of neuroblasts during neurohistogenesis in mammals, particularly man. Thesis for Sc.D. degree (in Serbo-Croatian) (Belgrade).
- Rakic, P. (1971). Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res.* *33*, 471–476.
- Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* *145*, 61–83.
- Rakic, P. (1974). Neurons in Rhesus Monkey Visual Cortex: Systematic Relation between Time of Origin and Eventual Disposition. *Science* *183*, 425–427.
- Rakic, P. (1988). Specification of cerebral cortical areas. *Science* *241*, 170–176.
- Rakic, P. (2007). The radial edifice of cortical architecture: From neuronal silhouettes to genetic engineering. *Brain Res. Rev.* *55*, 204–219.
- Rakic, P., and Sidman, R.L. (1968). Supravital DNA Synthesis in the Developing Human and Mouse Brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *27*, 240–276.
- Ramón y Cajal, S. (1891). Sur la structure de l'écorce cérébrale de quelques mammifères. *Cellule* *7*, 125–176.
- Ramón y Cajal, S. (1894). La fine structure des centres nerveux. *Proc R Soc.*
- Ramón y Cajal, S. (1909). *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés* (Paris).
- Ramón y Cajal, S. (1913). Contribucion al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano. *Trab Lab Inuest Biol Uniu Madr.* 255–315.
- Raponi, E., Agenes, F., Delphin, C., Assard, N., Baudier, J., Legraverend, C., and Deloulme, J.-C. (2007). S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia* *55*, 165–177.
- Rash, B.G., and Grove, E.A. (2006). Area and layer patterning in the developing cerebral cortex. *Curr. Opin. Neurobiol.* *16*, 25–34.
- Rašin, M.-R., Gazula, V.-R., Breunig, J.J., Kwan, K.Y., Johnson, M.B., Liu-Chen, S., Li, H.-S., Jan, L.Y., Jan, Y.-N., Rakic, P., et al. (2007). Numb and Numb1 are required for maintenance of cadherin-based adhesion and polarity of neural progenitors. *Nat. Neurosci.* *10*, 819–827.
- Reichenbach, A., and Bringmann, A. (2013). New functions of Müller cells: New Functions of Müller Cells. *Glia* *61*, 651–678.
- Reichenbach, A., and Wolburg, H. (2004). Astrocytes and Ependymal Glia. In *Neuroglia*, H. Kettenmann, and B.R. Ransom, eds. (Oxford University Press), pp. 19–35.
- Reichenbach, A., Derouiche, A., and Kirchhoff, F. (2010). Morphology and dynamics of perisynaptic glia. *Brain Res. Rev.* *63*, 11–25.
- Renier, N., Wu, Z., Simon, D.J., Yang, J., Ariel, P., and Tessier-Lavigne, M. (2014). iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* *159*, 896–910.
- Retzius, G. (1894). *Biologische Untersuchungen Die Neuroglia des Gehirns beim Menschen und bei Saeugethieren*. Verl. Von Gustav Fisch. Jena 6.
- Richardson, D.S., and Lichtman, J.W. (2015). Clarifying Tissue Clearing. *Cell* *162*, 246–257.

- Rickmann, M., and Wolff, J. (1981). Differentiation of “preplate” neurons in the pallium of the rat. *Bibl Anat* 19, 142–146.
- del Río Hortega, P. (1918). Noticia de un nuevo y fácil método para la coloración de la neuroglia y el tejido conjuntivo. *Trab Lab Invest Biol* 367–378.
- del Río Hortega, P. (1920). Estudios sobre la neuroglía. La microglía y su transformación en células en bastoncito y cuerpos granuloadiposos. *Trab Lab Invest Biol* 37–82.
- del Río Hortega, P. (1921). La glía de escasas radiaciones (oligodendroglía). *Bol Real Soc Esp Hist Nat* 63–92.
- Risau, W. (1992). Development of the Vascular System of Organs and Tissues. In *Collateral Circulation*, W. Schaper, and J. Schaper, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 17–28.
- Rizzo, M.A., Springer, G.H., Granada, B., and Piston, D.W. (2004). An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat. Biotechnol.* 22, 445–449.
- Roeling, T.A.P., and Feirabend, H.K.P. (1988). Glial fiber pattern in the developing chicken cerebellum: Vimentin and glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunostaining. *Glia* 1, 398–402.
- Rohlmann, A., and Wolff, J.R. (1996). Subcellular Topography and Plasticity of Gap Junction Distribution on Astrocytes. In *Gap Junctions in the Nervous System*, (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 175–192.
- Rowitch, D.H. (2004). Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 409–419.
- Rowitch, D.H., and Kriegstein, A.R. (2010). Developmental genetics of vertebrate glial–cell specification. *Nature* 468, 214–222.
- Ruben, M.D., and Hogenesch, J.B. (2017). Circadian Rhythms: Move Over Neurons — Astrocytes Mediate SCN Clock Function. *Curr. Biol.* 27, R350–R352.
- Saab, A.S., Neumeyer, A., Jahn, H.M., Cupido, A., Simek, A.A.M., Boele, H.-J., Scheller, A., Le Meur, K., Gotz, M., Monyer, H., et al. (2012). Bergmann Glial AMPA Receptors Are Required for Fine Motor Coordination. *Science* 337, 749–753.
- Saijo, K., Winner, B., Carson, C.T., Collier, J.G., Boyer, L., Rosenfeld, M.G., Gage, F.H., and Glass, C.K. (2009). A Nurr1/CoREST Pathway in Microglia and Astrocytes Protects Dopaminergic Neurons from Inflammation-Induced Death. *Cell* 137, 47–59.
- Saito, T., and Nakatsuji, N. (2001). Efficient Gene Transfer into the Embryonic Mouse Brain Using in Vivo Electroporation. *Dev. Biol.* 240, 237–246.
- Sanes, J.R., Rubenstein, J.L., and Nicolas, J.F. (1986). Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *EMBO J.* 5, 3133–3142.
- Sato, Y., Kasai, T., Nakagawa, S., Tanabe, K., Watanabe, T., Kawakami, K., and Takahashi, Y. (2007). Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos. *Dev. Biol.* 305, 616–624.
- Sauer, B. (1987). Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2087–2096.
- Sauer, F.C. (1935). Mitosis in the neural tube. *J. Comp. Neurol.* 62, 377–405.
- Sauer, B., and Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5166–5170.

- Schipke, C.G., Haas, B., and Kettenmann, H. (2008). Astrocytes discriminate and selectively respond to the activity of a subpopulation of neurons within the barrel cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 18, 2450–2459.
- Schitine, C., Nogaroli, L., Costa, M.R., and Hedin-Pereira, C. (2015). Astrocyte heterogeneity in the brain: from development to disease. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 76.
- Schmechel, D.E., and Rakic, P. (1979). Arrested proliferation of radial glial cells during midgestation in rhesus monkey. *Nature* 277, 303–305.
- Schmidt, J.F., Agapova, O.A., Yang, P., Kaufman, P.L., and Hernandez, M.R. (2007). Expression of ephrinB1 and its receptor in glaucomatous optic neuropathy. *Br. J. Ophthalmol.* 91, 1219–1224.
- Schnitzer, J., and Karschin, A. (1986). The shape and distribution of astrocytes in the retina of the adult rabbit. *Cell Tissue Res.* 246, 91–102.
- Schüller, U., Heine, V.M., Mao, J., Kho, A.T., Dillon, A.K., Han, Y.-G., Huillard, E., Sun, T., Ligon, A.H., Qian, Y., et al. (2008). Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Shh-induced medulloblastoma. *Cancer Cell* 14, 123–134.
- Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E.W., Pollard, J.W., et al. (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336, 86–90.
- Schuermans, C., and Guillemot, F. (2002). Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 26–34.
- Schuermans, C., Armant, O., Nieto, M., Stenman, J.M., Britz, O., Klenin, N., Brown, C., Langevin, L.-M., Seibt, J., Tang, H., et al. (2004). Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* 23, 2892–2902.
- Scorcioni, R., Polavaram, S., and Ascoli, G.A. (2008). L-Measure: a web-accessible tool for the analysis, comparison and search of digital reconstructions of neuronal morphologies. *Nat. Protoc.* 3, 866–876.
- Scott, C.E., Wynn, S.L., Sesay, A., Cruz, C., Cheung, M., Gomez Gavira, M.-V., Booth, S., Gao, B., Cheah, K.S.E., Lovell-Badge, R., et al. (2010). SOX9 induces and maintains neural stem cells. *Nat. Neurosci.* 13, 1181–1189.
- Sentürk, A., Pfennig, S., Weiss, A., Burk, K., and Acker-Palmer, A. (2011). Ephrin Bs are essential components of the Reelin pathway to regulate neuronal migration. *Nature* 472, 356–360.
- Seo, J., Choe, M., and Kim, S.-Y. (2016). Clearing and Labeling Techniques for Large-Scale Biological Tissues. *Mol. Cells* 39, 439–446.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E., and Tsien, R.Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22, 1567–1572.
- Shcherbakova, D.M., and Verkhusha, V.V. (2013). Near-infrared fluorescent proteins for multicolor in vivo imaging. *Nat. Methods* 10, 751–754.
- Shibata, T., Yamada, K., Watanabe, M., Ikenaka, K., Wada, K., Tanaka, K., and Inoue, Y. (1997). Glutamate Transporter GLAST Is Expressed in the Radial Glia–Astrocyte Lineage of Developing Mouse Spinal Cord. *J. Neurosci.* 17, 9212–9219.
- Shitamukai, A., Konno, D., and Matsuzaki, F. (2011). Oblique Radial Glial Divisions in the Developing Mouse Neocortex Induce Self-Renewing Progenitors outside the Germinal Zone That Resemble Primate Outer Subventricular Zone Progenitors. *J. Neurosci.* 31, 3683–3695.

- Sholl, D.A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J. Anat.* *87*, 387–406.
- Siddiqi, F., Chen, F., Aron, A.W., Fiondella, C.G., Patel, K., and LoTurco, J.J. (2014). Fate mapping by piggyBac transposase reveals that neocortical GLAST+ progenitors generate more astrocytes than Nestin+ progenitors in rat neocortex. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* *24*, 508–520.
- Siegenthaler, J.A., and Pleasure, S.J. (2011). We have got you ‘covered’: how the meninges control brain development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *21*, 249–255.
- Siegenthaler, J.A., Ashique, A.M., Zarbališ, K., Patterson, K.P., Hecht, J.H., Kane, M.A., Folias, A.E., Choe, Y., May, S.R., Kume, T., et al. (2009). Retinoic Acid from the Meninges Regulates Cortical Neuron Generation. *Cell* *139*, 597–609.
- Silver, D.P., and Livingston, D.M. (2001). Self-excising retroviral vectors encoding the Cre recombinase overcome Cre-mediated cellular toxicity. *Mol. Cell* *8*, 233–243.
- Sims, R.E., Butcher, J.B., Parri, H.R., and Glazewski, S. (2015). Astrocyte and Neuronal Plasticity in the Somatosensory System. *Neural Plast.* *2015*, 732014.
- Smart, I. (1961). The subependymal layer of the mouse brain and its cell production as shown by radioautography after thymidine-H3 injection. *J. Comp. Neurol.* *116*, 325–347.
- Smart, I., and Leblond, C.P. (1961). Evidence for division and transformations of neuroglia cells in the mouse brain, as derived from radioautography after injection of thymidine-H3. *J. Comp. Neurol.* *116*, 349–367.
- Smiałowska, M., Szewczyk, B., Woźniak, M., Wawrzak-Wleciał, A., and Domin, H. (2013). Glial degeneration as a model of depression. *Pharmacol. Rep. PR* *65*, 1572–1579.
- Snippert, H.J., van der Flier, L.G., Sato, T., van Es, J.H., van den Born, M., Kroon-Veenboer, C., Barker, N., Klein, A.M., van Rheenen, J., Simons, B.D., et al. (2010). Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell* *143*, 134–144.
- Sofroniew, M.V. (2005). Reactive Astrocytes in Neural Repair and Protection. *The Neuroscientist* *11*, 400–407.
- Sofroniew, M.V. (2014). Astrogliosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *7*, a020420.
- Sofroniew, M.V., and Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *119*, 7–35.
- Somjen, G.G. (1988). Nervenkit: Notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia* *1*, 2–9.
- Sosunov, A.A., Guilfoyle, E., Wu, X., McKhann, G.M., and Goldman, J.E. (2013). Phenotypic conversions of “protoplasmic” to “reactive” astrocytes in Alexander disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 7439–7450.
- Sosunov, A.A., Wu, X., Tsankova, N.M., Guilfoyle, E., McKhann, G.M., and Goldman, J.E. (2014). Phenotypic Heterogeneity and Plasticity of Isocortical and Hippocampal Astrocytes in the Human Brain. *J. Neurosci.* *34*, 2285–2298.
- Spalteholz, W. (1914). *Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen: Nebst Anhang, über Knochenfärbung* (Verlag Von S. Hirzel).
- Spassky, N., Merkle, F.T., Flames, N., Tramontin, A.D., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2005). Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 10–18.

- Spemann, H., and Mangold, H. (1924). über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Arch. Für Mikrosk. Anat. Entwicklungsmechanik* *100*, 599–638.
- Stafstrom, C.E., and Carmant, L. (2015). Seizures and epilepsy: an overview for neuroscientists. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *5*.
- Staudt, T., Lang, M.C., Medda, R., Engelhardt, J., and Hell, S.W. (2007). 2,2'-thiodiethanol: a new water soluble mounting medium for high resolution optical microscopy. *Microsc. Res. Tech.* *70*, 1–9.
- Stenman, J., Yu, R.T., Evans, R.M., and Campbell, K. (2003). Tlx and Pax6 co-operate genetically to establish the pallio-subpallial boundary in the embryonic mouse telencephalon. *Development* *130*, 1113–1122.
- Stogsdill, J.A., Ramirez, J., Liu, D., Kim, Y.H., Baldwin, K.T., Enustun, E., Ejikeme, T., Ji, R.-R., and Eroglu, C. (2017). Astrocytic neuroligins control astrocyte morphogenesis and synaptogenesis. *Nature* *551*, 192–197.
- Stolt, C.C. (2003). The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev.* *17*, 1677–1689.
- Stubbs, D., DeProto, J., Nie, K., Englund, C., Mahmud, I., Hevner, R., and Molnár, Z. (2009). Neurovascular congruence during cerebral cortical development. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* *19 Suppl 1*, i32-41.
- Stupp, R., Brada, M., van den Bent, M.J., Tonn, J.-C., Pentheroudakis, G., and ESMO Guidelines Working Group (2014). High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *25 Suppl 3*, iii93-101.
- Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G., and Thomson, J.N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* *100*, 64–119.
- Sun, W., Cornwell, A., Li, J., Peng, S., Osorio, M.J., Aalling, N., Wang, S., Benraiss, A., Lou, N., Goldman, S.A., et al. (2017). Sox9 Is an Astrocyte-Specific Nuclear Marker in the Adult Brain Outside the Neurogenic Regions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *37*, 4493–4507.
- Sur, M., and Rubenstein, J.L.R. (2005). Patterning and plasticity of the cerebral cortex. *Science* *310*, 805–810.
- Susaki, E.A., Tainaka, K., Perrin, D., Kishino, F., Tawara, T., Watanabe, T.M., Yokoyama, C., Onoe, H., Eguchi, M., Yamaguchi, S., et al. (2014). Whole-Brain Imaging with Single-Cell Resolution Using Chemical Cocktails and Computational Analysis. *Cell* *157*, 726–739.
- Susaki, E.A., Tainaka, K., Perrin, D., Yukinaga, H., Kuno, A., and Ueda, H.R. (2015). Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging. *Nat. Protoc.* *10*, 1709–1727.
- Swinnen, N., Smolders, S., Avila, A., Notelaers, K., Paesen, R., Ameloot, M., Brône, B., Legendre, P., and Rigo, J.-M. (2013). Complex invasion pattern of the cerebral cortex by microglial cells during development of the mouse embryo. *Glia* *61*, 150–163.
- Szentagothai, J. (1978). The Ferrier Lecture, 1977: The Neuron Network of the Cerebral Cortex: A Functional Interpretation. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* *201*, 219–248.
- Tabata, H. (2015). Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. *Front. Neurosci.* *9*.
- Tabata, H., and Nakajima, K. (2001). Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: visualization of neuronal migration in the developing cortex. *Neuroscience* *103*, 865–872.

- Tabata, H., and Nakajima, K. (2003). Multipolar Migration: The Third Mode of Radial Neuronal Migration in the Developing Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* *23*, 9996–10001.
- Tainaka, K., Kubota, S.I., Suyama, T.Q., Susaki, E.A., Perrin, D., Ukai-Tadenuma, M., Ukai, H., and Ueda, H.R. (2014). Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization. *Cell* *159*, 911–924.
- Takahashi, T., Nowakowski, R.S., and Caviness, V.S. (1995). The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *15*, 6046–6057.
- Takahashi, T., Nowakowski, R.S., and Caviness, V.S. (1996). The leaving or Q fraction of the murine cerebral proliferative epithelium: a general model of neocortical neurogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *16*, 6183–6196.
- Takano, T., Tian, G.-F., Peng, W., Lou, N., Libionka, W., Han, X., and Nedergaard, M. (2006). Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat. Neurosci.* *9*, 260–267.
- Takata, N., and Hirase, H. (2008). Cortical Layer 1 and Layer 2/3 Astrocytes Exhibit Distinct Calcium Dynamics In Vivo. *PLoS ONE* *3*, e2525.
- Takebayashi, H., Nabeshima, Y., Yoshida, S., Chisaka, O., Ikenaka, K., and Nabeshima, Y. (2002). The Basic Helix-Loop-Helix Factor Olig2 Is Essential for the Development of Motoneuron and Oligodendrocyte Lineages. *Curr. Biol.* *12*, 1157–1163.
- Tamamaki, N., Nakamura, K., Okamoto, K., and Kaneko, T. (2001). Radial glia is a progenitor of neocortical neurons in the developing cerebral cortex. *Neurosci. Res.* *41*, 51–60.
- Tan, S.-S., and Breen, S. (1993). Radial mosaicism and tangential cell dispersion both contribute to mouse neocortical development. *Nature* *362*, 638–640.
- Tan, X., and Shi, S.-H. (2013). Neocortical neurogenesis and neuronal migration. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* *2*, 443–459.
- Tan, S.S., Faulkner-Jones, B., Breen, S.J., Walsh, M., Bertram, J.F., and Reese, B.E. (1995). Cell dispersion patterns in different cortical regions studied with an X-inactivated transgenic marker. *Dev. Camb. Engl.* *121*, 1029–1039.
- Tarabykin, V., Stoykova, A., Usman, N., and Gruss, P. (2001). Upper cortical layers and the subventricular zone. *Development* *128*, 1983–1993.
- Tasker, J.G., Oliet, S.H.R., Bains, J.S., Brown, C.H., and Stern, J.E. (2012). Glial Regulation of Neuronal Function: From Synapse to Systems Physiology: Glial regulation of MNC activity. *J. Neuroendocrinol.* *24*, 566–576.
- Tatsumi, K., Isonishi, A., Yamasaki, M., Kawabe, Y., Morita-Takemura, S., Nakahara, K., Terada, Y., Shinjo, T., Okuda, H., Tanaka, T., et al. (2018). Olig2-Lineage Astrocytes: A Distinct Subtype of Astrocytes That Differs from GFAP Astrocytes. *Front. Neuroanat.* *12*.
- Tavares, G., Martins, M., Correia, J.S., Sardinha, V.M., Guerra-Gomes, S., das Neves, S.P., Marques, F., Sousa, N., and Oliveira, J.F. (2017). Employing an open-source tool to assess astrocyte tridimensional structure. *Brain Struct. Funct.* *222*, 1989–1999.
- Thomsen, R., Pallesen, J., Daugaard, T.F., Børglum, A.D., and Nielsen, A.L. (2013). Genome wide assessment of mRNA in astrocyte protrusions by direct RNA sequencing reveals mRNA localization for the intermediate filament protein nestin. *Glia* *61*, 1922–1937.
- Tien, A.-C., Tsai, H.-H., Molofsky, A.V., McMahon, M., Foo, L.C., Kaul, A., Dougherty, J.D., Heintz, N., Gutmann, D.H., Barres, B.A., et al. (2012). Regulated temporal-spatial astrocyte precursor cell proliferation involves BRAF signalling in mammalian spinal cord. *Development* *139*, 2477–2487.

- Tissir, F., and Goffinet, A.M. (2003). Reelin and brain development. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 496–505.
- Tong, X., Shigetomi, E., Looger, L.L., and Khakh, B.S. (2013). Genetically Encoded Calcium Indicators and Astrocyte Calcium Microdomains. *The Neuroscientist* *19*, 274–291.
- Torper, O., Pfisterer, U., Wolf, D.A., Pereira, M., Lau, S., Jakobsson, J., Björklund, A., Grealish, S., and Parmar, M. (2013). Generation of induced neurons via direct conversion in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 7038–7043.
- Tout, S., Dreher, Z., Chan-ling, T., and Stone, J. (1993). Contact-spacing among astrocytes is independent of neighbouring structures: In vivo and in vitro evidence. *J. Comp. Neurol.* *332*, 433–443.
- Treutlein, B., Lee, Q.Y., Camp, J.G., Mall, M., Koh, W., Shariati, S.A.M., Sim, S., Neff, N.F., Skotheim, J.M., Wernig, M., et al. (2016). Dissecting direct reprogramming from fibroblast to neuron using single-cell RNA-seq. *Nature* *534*, 391.
- Treweek, J.B., Chan, K.Y., Flytzanis, N.C., Yang, B., Deverman, B.E., Greenbaum, A., Lignell, A., Xiao, C., Cai, L., Ladinsky, M.S., et al. (2015). Whole-body tissue stabilization and selective extractions via tissue-hydrogel hybrids for high-resolution intact circuit mapping and phenotyping. *Nat. Protoc.* *10*, 1860–1896.
- Trichas, G., Begbie, J., and Srinivas, S. (2008). Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice. *BMC Biol.* *6*, 40.
- Trotter, J., Karram, K., and Nishiyama, A. (2010). NG2 cells: Properties, progeny and origin. *Brain Res. Rev.* *63*, 72–82.
- Tsai, L.-H., and Gleeson, J.G. (2005). Nucleokinesis in neuronal migration. *Neuron* *46*, 383–388.
- Tsai, H.-H., Li, H., Fuentealba, L.C., Molofsky, A.V., Taveira-Marques, R., Zhuang, H., Tenney, A., Murnen, A.T., Fancy, S.P.J., Merkle, F., et al. (2012). Regional Astrocyte Allocation Regulates CNS Synaptogenesis and Repair. *Science* *337*, 358–362.
- Turner, D.L., and Cepko, C.L. (1987). A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* *328*, 131–136.
- Ullian, E.M., Sapperstein, S.K., Christopherson, K.S., and Barres, B.A. (2001). Control of Synapse Number by Glia. *Science* *291*, 657–661.
- Valcanis, H., and Tan, S.-S. (2003). Layer Specification of Transplanted Interneurons in Developing Mouse Neocortex. *J. Neurosci.* *23*, 5113–5122.
- Vangeison, G., and Rempe, D.A. (2009). The Janus-Faced Effects of Hypoxia on Astrocyte Function. *The Neuroscientist* *15*, 579–588.
- Vasistha, N.A., García-Moreno, F., Arora, S., Cheung, A.F.P., Arnold, S.J., Robertson, E.J., and Molnár, Z. (2015). Cortical and Clonal Contribution of Tbr2 Expressing Progenitors in the Developing Mouse Brain. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* *25*, 3290–3302.
- Vasudevan, A., Long, J.E., Crandall, J.E., Rubenstein, J.L.R., and Bhide, P.G. (2008). Compartment-specific transcription factors orchestrate angiogenesis gradients in the embryonic brain. *Nat. Neurosci.* *11*, 429–439.
- Ventura, R., and Harris, K.M. (1999). Three-Dimensional Relationships between Hippocampal Synapses and Astrocytes. *J. Neurosci.* *19*, 6897–6906.
- Ventura, R.E., and Goldman, J.E. (2007). Dorsal Radial Glia Generate Olfactory Bulb Interneurons in the Postnatal Murine Brain. *J. Neurosci.* *27*, 4297–4302.

- Vigouroux, R.J., Belle, M., and Chédotal, A. (2017). Neuroscience in the third dimension: shedding new light on the brain with tissue clearing. *Mol. Brain* 10, 33.
- Virchow, R. (1846). Über das granulierte ansehn der Wandungen der Gehirnventrikel. *Allg Z Psychiatr* 3, 242–250.
- Virchow, R. (1856). *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin*. Verl. Von Meidinger Sohn Comp.
- Virchow, R. (1858). *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre* (Berlin: Hirschwald).
- Voigt, T. (1989). Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: Direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J. Comp. Neurol.* 289, 74–88.
- Volterra, A., and Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 626–640.
- Walsh, C., and Cepko, C. (1988). Clonally related cortical cells show several migration patterns. *Science* 241, 1342–1345.
- Walsh, C., and Cepko, C.L. (1992). Widespread dispersion of neuronal clones across functional regions of the cerebral cortex. *Science* 255, 434–440.
- Walsh, C., and Cepko, C.L. (1993). Clonal dispersion in proliferative layers of developing cerebral cortex. *Nature* 362, 632–635.
- Wang, T., and Xiong, J.-Q. (2016). The Orphan Nuclear Receptor TLX/NR2E1 in Neural Stem Cells and Diseases. *Neurosci. Bull.* 32, 108–114.
- Wang, X., Chang, L., Guo, Z., Li, W., Liu, W., Cai, B., and Wang, J. (2013). Neonatal SVZ EGFP-labeled cells produce neurons in the olfactory bulb and astrocytes in the cerebral cortex by in-vivo electroporation. *Neuroreport* 24, 381–387.
- Watkins, T.A., Emery, B., Mulinyawe, S., and Barres, B.A. (2008). Distinct Stages of Myelination Regulated by γ -Secretase and Astrocytes in a Rapidly Myelinating CNS Coculture System. *Neuron* 60, 555–569.
- Weigert, C. (1895). Beiträge zur Kenntnis der normalen menschlichen Neuroglia. *Abh Senckenberg Naturforsch Gesell* 19, 65–216.
- Weissman, T.A., and Pan, Y.A. (2015). Brainbow: new resources and emerging biological applications for multicolor genetic labeling and analysis. *Genetics* 199, 293–306.
- Wilhelmsson, U., Bushong, E.A., Price, D.L., Smarr, B.L., Phung, V., Terada, M., Ellisman, M.H., and Pekny, M. (2006). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 17513–17518.
- Wimmer, V.C., and Möller, A. (2010). High-Resolution Confocal Imaging in Tissue. In *Histology Protocols*, T.D. Hewitson, and I.A. Darby, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 183–191.
- Windrem, M.S., Schanz, S.J., Morrow, C., Munir, J., Chandler-Militello, D., Wang, S., and Goldman, S.A. (2014). A Competitive Advantage by Neonatally Engrafted Human Glial Progenitors Yields Mice Whose Brains Are Chimeric for Human Glia. *J. Neurosci.* 34, 16153–16161.
- Wolburg, H., Noell, S., Mack, A., Wolburg-Buchholz, K., and Fallier-Becker, P. (2009). Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res.* 335, 75–96.

- Yamamoto, M., Shook, N.A., Kanisicak, O., Yamamoto, S., Wosczyzna, M.N., Camp, J.R., and Goldhamer, D.J. (2009). A multifunctional reporter mouse line for Cre- and FLP-dependent lineage analysis. *Genesis* 47, 107–114.
- Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Sugiyama, Y., Ishiyama, C., Suzuki, A., Hirose, T., Iwamatsu, A., Shinohara, A., and Ohno, S. (2003). Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr. Biol. CB* 13, 734–743.
- Yang, B., Treweek, J.B., Kulkarni, R.P., Deverman, B.E., Chen, C.-K., Lubeck, E., Shah, S., Cai, L., and Gradinaru, V. (2014). Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. *Cell* 158, 945–958.
- Yoshida, A., Yamaguchi, Y., Nonomura, K., Kawakami, K., Takahashi, Y., and Miura, M. (2010). Simultaneous expression of different transgenes in neurons and glia by combining *in utero* electroporation with the *Tox2* transposon-mediated gene transfer system. *Genes Cells*.
- Yoshida, M., Suda, Y., Matsuo, I., Miyamoto, N., Takeda, N., Kuratani, S., and Aizawa, S. (1997). *Emx1* and *Emx2* functions in development of dorsal telencephalon. 11.
- Young, J.Z. (1991). The Concept of Neuroglia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 633, 1–18.
- Yu, Y.-C., Bultje, R.S., Wang, X., and Shi, S.-H. (2009). Specific synapses develop preferentially among sister excitatory neurons in the neocortex. *Nature* 458, 501–504.
- Zacharias, D.A., Violin, J.D., Newton, A.C., and Tsien, R.Y. (2002). Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* 296, 913–916.
- Zerlin, M., Levison, S., and Goldman, J. (1995). Early patterns of migration, morphogenesis, and intermediate filament expression of subventricular zone cells in the postnatal rat forebrain. *J. Neurosci.* 15, 7238–7249.
- Zhou, Q., Wang, S., and Anderson, D.J. (2000). Identification of a Novel Family of Oligodendrocyte Lineage-Specific Basic Helix–Loop–Helix Transcription Factors. *Neuron* 25, 331–343.
- Zhu, X., Bergles, D.E., and Nishiyama, A. (2007). NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. *Development* 135, 145–157.
- Zhu, X., Hill, R.A., Dietrich, D., Komitova, M., Suzuki, R., and Nishiyama, A. (2011). Age-dependent fate and lineage restriction of single NG2 cells. *Dev. Camb. Engl.* 138, 745–753.
- Zhuo, L., Sun, B., Zhang, C.-L., Fine, A., Chiu, S.-Y., and Messing, A. (1997). Live Astrocytes Visualized by Green Fluorescent Protein in Transgenic Mice. *Dev. Biol.* 187, 36–42.
- Zimmer, C., Tiveron, M.-C., Bodmer, R., and Cremer, H. (2004). Dynamics of *Cux2* Expression Suggests that an Early Pool of SVZ Precursors is Fated to Become Upper Cortical Layer Neurons. *Cereb. Cortex* 14, 1408–1420.
- Zimmer, G., Garcez, P., Rudolph, J., Niehage, R., Weth, F., Lent, R., and Bolz, J. (2008). Ephrin-A5 acts as a repulsive cue for migrating cortical interneurons: Ephrin-A5 affects migrating cortical interneurons. *Eur. J. Neurosci.* 28, 62–73.
- Zong, H., Espinosa, J.S., Su, H.H., Muzumdar, M.D., and Luo, L. (2005). Mosaic analysis with double markers in mice. *Cell* 121, 479–492.
- Zuo, Y., Lubischer, J.L., Kang, H., Le, T., Mikesch, M., Alexander, M., Scofield, V.L., Maika, S., Newman, C., Krieg, P., et al. (2004). Fluorescent Proteins Expressed in Mouse Transgenic Lines Mark Subsets of Glia, Neurons, Macrophages, and Dendritic Cells for Vital Examination. *J. Neurosci.* 24, 10999–11009.

Annexes

Article 1 (en révision)

IMAGERIE CEREBRALE MULTICOLORE A ECHELLES MULTIPLES PAR MICROSCOPIE MULTIPHOTONIQUE CHROMATIQUE SERIEE

Lamiae Abdeladim ¹, Katherine S. Matho ^{1,2,3}, **Solène Clavreul** ^{2,†}, Pierre Mahou ^{1,†}, Jean-Marc Sintès ¹, Xavier Solinas ¹, Ignacio Arganda-Carreras ⁴, Stephen G. Turney ⁵, Jeff W. Lichtman ⁵, Alexis-Pierre Bemelmans ⁶, Karine Loulier ², Willy Supatto ¹, Jean Livet ^{2,*}, Emmanuel Beaurepaire ^{1,*}

AFFILIATIONS

¹ Laboratory for Optics and Biosciences, Ecole polytechnique, CNRS, INSERM, Palaiseau, France

² Institut de la Vision, Sorbonne Universités, INSERM, CNRS, Paris, France

³ Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA

⁴ University of the Basque Country (Ikerbasque) and Donostia International Physics Center, San Sebastian, Spain

⁵ Center for Brain Science and Department of Molecular and Cellular Biology, Harvard University, Cambridge, MA, USA

⁶ Neurodegenerative Diseases Laboratory, Molecular Imaging Research Center, Institut de Biologie François Jacob, CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Fontenay-aux-Roses, France

† Contribution égale

* Correspondance. emmanuel.beaurepaire@polytechnique.edu, jean.livet@inserm.fr

RESUME

Les approches de microscopie à grande échelle sont en train de transformer l'imagerie cérébrale, mais manquent actuellement de modalités de contraste multicolore efficaces. Nous présentons ici la microscopie multiphotonique chromatique sériée (Chrom-SMP), une méthode intégrant une excitation multiphotonique multicolore unique par mélange de longueurs d'ondes et l'acquisition d'images par blocs sériés. Cette approche fournit une imagerie micrométrique à l'échelle de l'organe à la fois de protéines fluorescentes spectralement distinctes et de l'émission cohérente anti-Stokes (CARS) ou par génération de troisième harmonique (THG) sans marquage, avec une résolution constante à l'échelle du micromètre et une fusion des canaux sub-micrométriques sur tout le volume imagé. Nous démontrons l'efficacité de l'imagerie multicolore 3D sur plusieurs millimètres cubes, ainsi que l'imagerie multicanaux sériée 2D sur cerveau entier. Nous illustrons les points forts de cette méthode par l'analyse tridimensionnelle multicolore de la morphologie et des interactions des astrocytes dans le cortex cérébral murin et la cartographie de projections axonales marquées par des traceurs distincts dans le cerveau entier murin.

Multicolor multiscale brain imaging with chromatic serial multiphoton microscopy

Lamiae Abdeladim ¹, Katherine S. Matho ^{1,2,3}, Solène Clavreul ^{2,†}, Pierre Mahou ^{1,†}, Jean-Marc Sintes ¹, Xavier Solinas ¹, Ignacio Arganda-Carreras ⁴, Stephen G. Turney ⁵, Jeff W. Lichtman ⁵, Alexis-Pierre Bemelmans ⁶, Karine Loulier ², Willy Supatto ¹, Jean Livet ^{2,*}, Emmanuel Beaurepaire ^{1,*}

¹ Laboratory for Optics and Biosciences, Ecole polytechnique, CNRS, INSERM, Palaiseau, France

² Institut de la Vision, Sorbonne Universités, INSERM, CNRS, Paris, France

³ Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA

⁴ University of the Basque Country (Ikerbasque) and Donostia International Physics Center, San Sebastian, Spain

⁵ Center for Brain Science and Department of Molecular and Cellular Biology, Harvard University, Cambridge, MA, USA

⁶ Neurodegenerative Diseases Laboratory, Molecular Imaging Research Center, Institut de Biologie François Jacob, CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Fontenay-aux-Roses, France

† these authors contributed equally

* corresp. emmanuel.beaurepaire@polytechnique.edu , jean.livet@inserm.fr

Abstract

Large-scale microscopy approaches are transforming brain imaging, but currently lack efficient multicolor contrast modalities. We introduce chromatic serial multiphoton (Chrom-SMP) microscopy, a method integrating one-shot multicolor multiphoton excitation through wavelength mixing and serial block-face image acquisition. This approach provides organ-scale micrometric imaging of spectrally distinct fluorescent proteins and label-free third harmonic generation (THG) / coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) nonlinear contrasts, with constant micrometer-scale resolution and sub-micron channel registration over the entire imaged volume. We demonstrate 3D multicolor imaging over several cubic millimeters as well as brain-wide serial 2D multichannel imaging. We illustrate the strengths of this method through color-based tridimensional analysis of astrocyte morphology and interactions in the mouse cerebral cortex and multiplexed whole-brain mapping of axonal projections labeled with distinct tracers.

Introduction

Multicolor fluorescence microscopy has become a key enabling technology in biology by providing the means to spectrally resolve cells, organelles or molecules within tissues and to analyze their interactions. Strategies combining multiple distinct fluorescent labels ¹ are increasingly used to study spatial relationships among cells and molecules and to encode parameters such as cell-type identity ², lineage ^{3,4}, cycling state ⁵, connectivity ^{6–10}, genotype ^{11,12}, or signaling pathway activation ¹³. Scaling up such approaches at the whole organ or tissue level would be a major step forward but is hindered by the lack of suitable large-volume multicolor microscopy methods. In recent years, serial block-face imaging, which relies on the automated, iterative alternation of imaging and microtome-based sectioning of a block of tissue, has been successfully transposed from electron microscopy to light microscopy ^{14–17}. This paradigm has emerged as an effective means for generating data encompassing mm³-to-cm³ volumes of tissue at subcellular-resolution with either discrete or continuous sampling. One particularly active field of application is neuroscience, where these approaches have opened the way to brain-wide mesoscale connectomics ^{15,18} and single neuron reconstruction efforts ^{18–21}. However, microtome-assisted microscopy methods developed so far are limited to single- or dual-color imaging ^{15,16,18,21}. This limitation is due to the general difficulty of exciting a manifold of fluorescent proteins. In addition, achieving tissue-scale multicolor microscopic imaging requires addressing chromatic aberrations and channel registration over large volumes. These obstacles made it so far very difficult to probe cell interactions or more generally to image multiplexed or combinatorial fluorescent signals with micrometer-scale precision in samples exceeding a few hundreds of microns in depth.

Here, we report on a novel method for volume multicolor and multi-contrast microscopy with submicrometer registration of the image channels. Our approach, termed Chromatic Serial MultiPhoton (Chrom-SMP) microscopy, relies on the integration of trichromatic two-photon excitation by wavelength mixing (WM) ²² with automated serial tissue sectioning. In addition to being perfectly suited for use with multiplexed or combinatorial fluorescence labeling strategies, this scheme enables organ-wide imaging of label-free nonlinear contrasts such as third harmonic generation (THG) and coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS). As a demonstration, we use it for tridimensional imaging of mouse brains labeled by transgenic-¹, electroporation-³ or viral-based multicolor approaches. We show that Chrom-SMP enables brain-wide multicolor fluorescence imaging with intrinsic channel registration and provides access to cytoarchitecture and myelinated tract organization using simultaneously generated label-free nonlinear signals.

Chrom-SMP delivers multicolor/multimodal imaging of $>mm^3$ volumes with submicron channel coregistration, which set new quality standards for multicontrast large-scale microscopy. We illustrate the potential of this approach for high information-content three-dimensional (3D) imaging through analysis of astroglial cell morphology and interactions of glia over several mm^3 of cerebral cortex and brain-wide color-based multiplexed mapping of axonal projection trajectories and interdigitation.

Results

Chrom-SMP: multicolor/multicontrast organ-scale microscopy. In Chrom-SMP microscopy, the sample (whole organ or large piece of tissue) is crosslinked with an embedding agarose block, and large-scale imaging is achieved by automatically alternating simultaneous multimodal acquisitions (4 independent channels in the implementation used for this work), stage-based lateral mosaicking, and tissue sectioning with a vibrating-blade microtome. Simultaneous two-photon excitation in three distinct spectral bands is provided by the spatio-temporal overlap of two synchronized femtosecond infrared pulse trains at separate wavelengths λ_1 and λ_2 (Fig 1a). For example, one can choose $\lambda_1 = 850$ and $\lambda_2 = 1100$ nm for optimal two-photon excitation of blue and red chromophores. Synchronization of the two pulses then gives access to two-color multiphoton excitation processes and in particular creates a ‘virtual’ two-photon excitation wavelength at $2/(\lambda_1^{-1} + \lambda_2^{-1}) \approx 959$ nm, suitable for excitation of green and/or yellow chromophores²². Tuning the power of the two pulses and their time delay enables to control the three excitation windows in a largely independent manner. This strategy provides efficient simultaneous two-photon excitation of several fluorescent proteins with emissions spanning the visible spectrum, as well as access to coherent label-free nonlinear contrasts such as third harmonic generation (THG) which reveals tissue structural details²³. One specific feature of the WM excitation scheme is that it also enables coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS)²⁴ imaging of a chosen vibrational mode along with detection of fluorescence and/or harmonic signals. A typical Chrom-SMP acquisition involves sequential sectioning of the upper tissue block layer (typically 100 microns) and mosaic-based imaging of the remaining intact block (Movie M1). Chrom-SMP can be programmed to acquire either 2D mosaics at discrete axial positions (e.g. every 100 μm) (brain-wide serial 2D or tomography mode, see Fig 1a), continuous 3D volumetric images through the recording of partially overlapping image stacks (lossless continuous mode, see Fig 1a), or combinations of both.

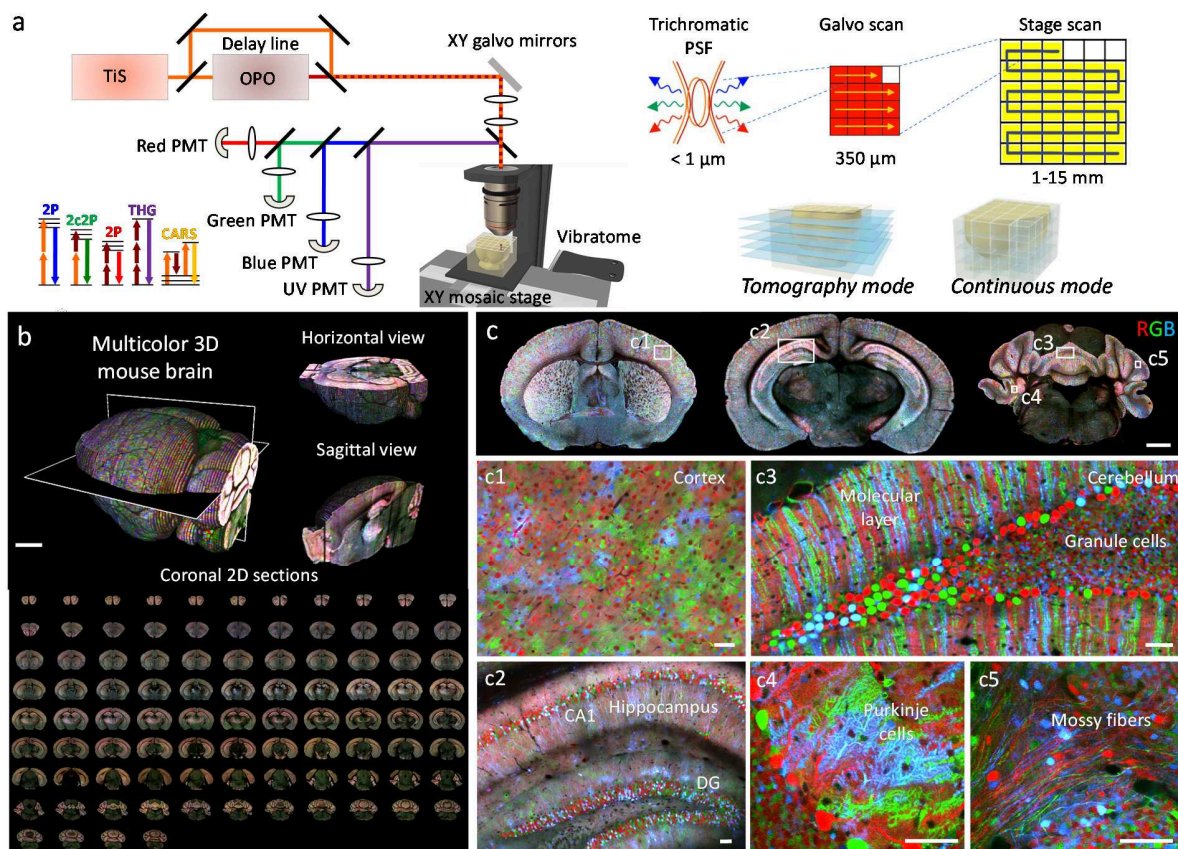


Figure 1. Chrom-SMP principle and application for whole brain multicolor serial imaging

(a) Chrom-SMP principle and setup. (b) 3D views from a whole *CAG-Cy5bow; Nestin-Cre* mouse brain ($10.5 \times 7.3 \times 9.2 \text{ mm}^3$) imaged with Chrom-SMP. Scale bar: 1 mm. (c) 2D sub-cellular multicolor brain-wide anatomical maps from the brain in b. Upper panel displays representative coronal views. Middle and lower panel correspond to magnified crops from boxed regions in the coronal views, demonstrating sub-cellular lateral resolution enabling the visualization of dendritic and axonal processes. See also Suppl Fig S1 and Movies M2-M5. Scale bars: 1 mm (upper panel), 50 μm (middle and lower panels). DG: Dentate Gyrus.

Multicolor brain-wide anatomical mapping with submicron resolution. To establish the ability of Chrom-SMP to deliver brain-wide diffraction-limited multicolor images, we recorded serial mosaics from brains of transgenic *Brainbow* mice (*CAG-Cy5bow; Nestin-Cre*). Dense yet mostly mutually exclusive neural expression of Turquoise2 / YFP / dTomato is observed throughout the entire brain of these animals. Fig 1b-c, Suppl Fig S1 and Movies M2-M5 present a multicolor 3D whole-brain dataset consisting of 92 self-registered three-channel coronal planes with a lateral sampling of 0.55 μm and a discrete axial sampling of 100 μm . Each coronal plane, ranging from the olfactory bulb to the brainstem, constitutes a comprehensive submicron neuroanatomical map

of labeled neurons and glial cells in which color contrast facilitates individual cell distinction. As shown in Fig 1c, the resolution provided by Chrom-SMP enables to visualize fine neural processes such as Purkinje cell dendrites and axons in the cerebellum. Chrom-SMP thus presents the sensitivity, spatial resolution, spectral discrimination and robustness, necessary for micrometric multicolor imaging of native transgenic fluorescent labels over entire mouse brains. In the serial tomography mode illustrated here, it constitutes an effective approach for comprehensive anatomical mapping of different color labels with individual cell resolution at the whole-organ scale.

Submicrometer color channels alignment over millimetric distances

A unique feature of the Chrom-SMP approach for large-volume multi-channel imaging is the intrinsic 3D submicron channel co-registration resulting from the excitation process, which makes it possible to assess and control chromatic aberrations over large volumes. Indeed, green fluorescence signals obtained through a wavelength mixing scheme provide an intrinsic quality check: they are observed only if the λ_1 and λ_2 excitation point spread functions overlap in 3D with submicron precision, in turn ensuring that all signals originate from the same diffraction-limited volume. We mitigated chromatic aberrations as follows. We used SHG nanocrystals to map chromatic shifts across the field as explained in ²⁵ and chose an excitation objective best suited for wavelength mixing ²⁵. We then optimized our scanning system using off-the shelf optics to correct for lateral chromatic aberrations over a field of approximately 400 μm . We inserted a telescope in each beam path prior to recombination in order to minimize their axial mismatch at focus. Overall, we obtained a color mismatch of less than 0.6 μm in all three dimensions over a field of view exceeding 350 μm . As illustrated in Fig 2, mosaicking preserves this nearly perfect matching between channels over cubic millimeters of imaged tissue. Chrom-SMP therefore benefits from the combination of tissue sectioning and point-scanning two-photon imaging which ensures homogeneous volumetric resolution and robustness to depth-induced image degradation. These performances enabled us to visualize submicron structures such as astrocyte processes and neurites with multicolor precision (i.e. not affected by chromatic aberrations) at arbitrary depths (see Fig 2) for the first time. Finally, we point out that trichromatic single-shot excitation is advantageous in terms of imaging speed compared to sequential acquisition of color channels, which is particularly relevant in the context of large volume acquisitions with point-scanning schemes ^{15,16,18}.

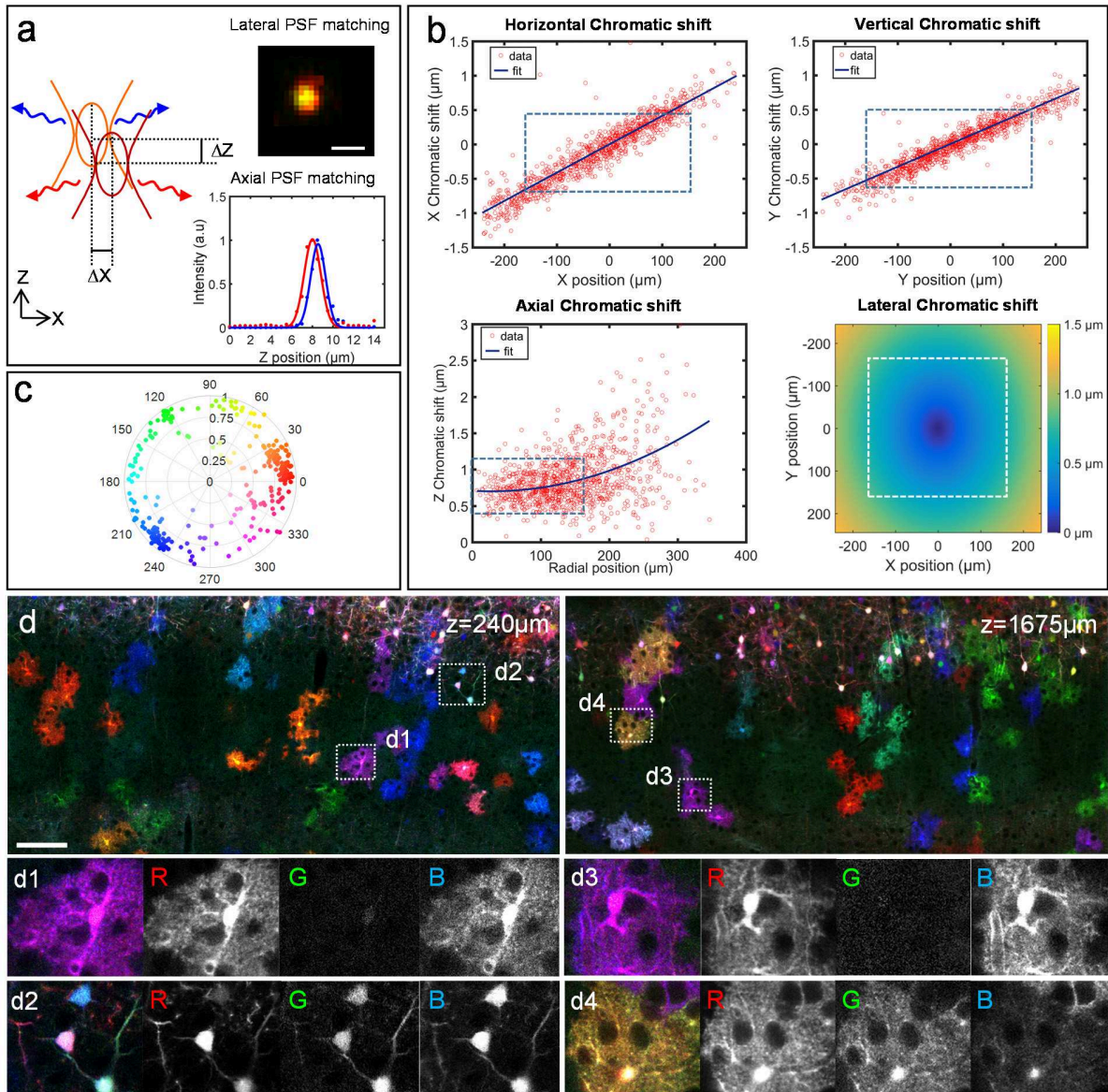


Figure 2. Submicrometer-scale channel registration over millimeter-scale volumes

(a,b) Second harmonic generation (SHG) signals from KTP nanocrystals were used to characterize the chromatic shifts across the field of view of the multicolor microscope. Chrom-SMP provides multicolor excitation in the 850-1100 nm range with less than $0.6 \mu\text{m}$ of chromatic shift in all three directions in the used field of view. This in turn enables accurate ratiometric imaging and access to multiple resolvable color combinations (c). As shown in (d), submicron resolution and chromatic accuracy are both preserved at arbitrary depths, a property which is specific to this imaging scheme. (a) Principles of point-spread function (PSF) matching for chromatic aberration control. For wavelength-mixing generation, overlap of the two PSFs is required. Axial and lateral chromatic shifts are measured using SHG nanocrystals. Top right: coalignment of the foci at the center of the field of view (fov). Bottom right: axial PSFs corresponding to the two beams measured were axially matched using telescopes placed on each beam path.

(b) Chromatic aberration characterization across the fov for the 850 nm/1100 nm wavelength combination. Top: Chromatic horizontal (resp. vertical) shift ΔX (resp. ΔY) as a function of the horizontal (resp. vertical) position in the fov. Measurements were performed on $n=1012$ KTP nanocrystals across the fov and data fitted using an affine model. Bottom left: Chromatic axial shift ΔZ (resp. ΔY) as a function of the radial position in the fov. Measurements were performed on $n=1037$ KTP nanocrystals across the fov and data fitted using a polynomial model. Bottom right: Lateral chromatic shift mapped across the fov. Lateral chromatic shift is defined as $(\Delta X^2 + \Delta Y^2)^{0.5}$ with ΔX and ΔY the corresponding fitted horizontal and vertical chromatic shifts. Dashed boxes outline the maximal effective fov used for Chrom-SMP imaging experiments. (c) Colorimetry of a combinatorial dataset acquired with Chrom-SMP. Hue-Saturation polar plot representing the color distribution of a MAGIC marker-labelled dataset after spectral unmixing. Multiple color combinations (>20) spanning this color space can be distinguished³. (d) Registration of multichannel images is maintained at all imaging depths. XY representative multicolor images from a MAGIC marker-labelled dataset acquired with Chrom-SMP with $0.4 \mu\text{m} \times 0.4 \mu\text{m} \times 1.5 \mu\text{m}$ voxel size. Inserts demonstrate channel co-registration at arbitrary depths within the dataset. Cell structures (astrocyte domains and processes, cell bodies, axons) can be visualized with multicolor precision (i.e not affected by chromatic aberrations) and discriminated with a quantitative color ratio. Scale bar: $100 \mu\text{m}$.

Multicolor 3D histology of cubic millimeter volumes of uncleared neural tissue. We then used Chrom-SMP to achieve continuous high-resolution 3D multicolor combinatorial imaging of uncleared brain tissue with constant resolution and contrast over the entire volume. Fig 3 and Movies M6-M7 show a $1.2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ portion of the cerebral cortex of an adult mouse brain continuously sampled with $0.4 \times 0.4 \times 1.5 \mu\text{m}^3$ voxel size, labeled in a semi-sparse manner by the MAGIC markers strategy³. This approach relying on electroporation of genome-integrative transgenes in embryonic neural progenitors efficiently labels with combinations of cyan, yellow and red FPs the descent of these cells: glial cells, in particular astrocytes, distributed throughout the cortical wall, as well as pyramidal neurons, here restricted to layer II-III. Post-acquisition linear unmixing was used to correct for the limited spectral bleed-through between channels due to the overlap of fluorescence emission spectra (Suppl Fig S2). In turn, this enabled colorimetric quantification of the trichromatic combinatorial labels (Figs 2 and S1). As discussed in reference³ and illustrated in Figs 2c and S3, more than 20 different color combinations are readily resolved from such multichannel data. We finally performed a 3D stitching of the multi-channel blocks (see Methods) and obtained a continuous dataset giving access to high-resolution 3D cell morphology in a densely labeled environment within the cortical volume (Fig 3). In particular, thousands of protoplasmic astrocytes were imaged in the cortical wall with micrometer-scale resolution and color overlap. The cell bodies and main cytoplasmic processes of these cells as well as the tridimensional domain of neural tissue occupied by their fine processes²⁶ were resolved

throughout the entire volume. This dataset also demonstrates multicolor axon-level resolution imaging of the densely labeled neurons located in the upper cortical layers (Fig 3).

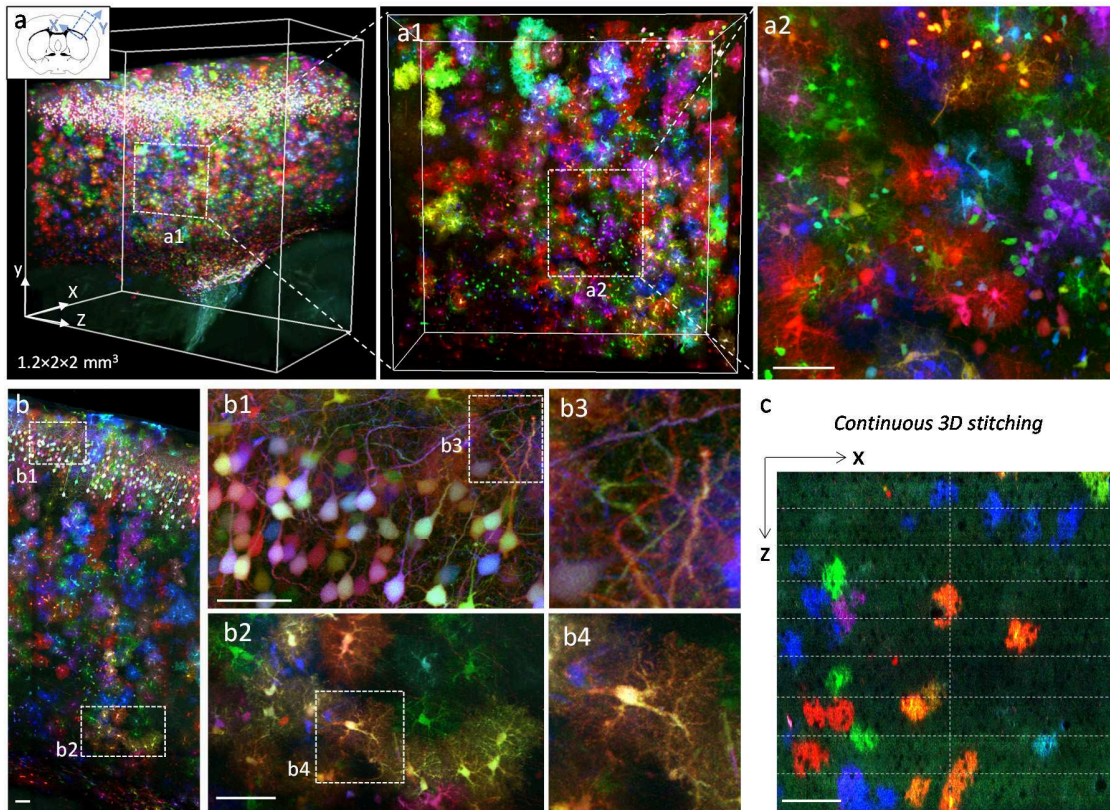


Figure 3. Continuous 3D multicolor imaging of mouse cortical tissue

(a) Multicolor 3D micrometric imaging of a $1.2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ volume of a P65 mouse cerebral cortex with Chrom-SMP, showing semi-sparse multicolor labeling with MAGIC markers. Scale bar: $50 \mu\text{m}$ (b) Maximum intensity projection over $500 \mu\text{m}$ and XY crosses showing high resolution imaging of axons and astrocyte processes with multicolor precision. Scale bars: $200 \mu\text{m}$ (right panel) and $50 \mu\text{m}$ (middle panel). (c) XZ view of 9 successively imaged blocks stitched in 3D, showing the continuity of the dataset in depth. Cellular structures are recovered from one block to another with no tissue loss. Scale bar: $100 \mu\text{m}$. See also Movies M6-M7.

Quantitative 3D cell morphometry of cortical astrocytes. Astrocytes, the main glial cell type of the brain, form an uninterrupted cellular network throughout the neuropil²⁶. Studying the organization of this network faces two difficulties: singling-out individual astrocytes from their neighbors and imaging these cells in their entirety. The multicolor labeling of astrocytes in the continuous tridimensional data presented above provided a unique opportunity to study their layout and interactions without biases introduced by tissue sectioning.

We first derived a reconstruction of the astroglial network over a depth of 1 mm (Figs 4 and S4), from a volume containing 1055 labeled astrocytes which we all positioned in 3D (Fig 4a). These astrocytes often formed clusters of juxtaposed cells expressing an identical color (n=261, Fig 3a), as expected from clonally-related cells generated by local proliferation²⁷. The finely resolved images made it possible to visualize the cell bodies engulfed within the domain of the labeled astrocytes (mostly neuronal, negatively contrasted in the images): we pointed 12265 such contacting cell bodies. By computing the average soma-to-astrocyte ratio in each cluster, we inferred that each mouse cortical astrocyte was in contact with an average of 12 ± 4 (mean \pm s.d, n=248) cells (Fig 4b).

We then performed 3D morphological analyses of individual astrocytes, taking advantage of isolated or color-segregated cells present in the dataset. We segmented the domains associated with these astrocytes within the imaged cortical portion to measure their volume (Fig 4b). This analysis pointed to significant volume variation between layer 4 astrocytes ($5.9 \times 10^4 \pm 1.2 \times 10^4 \mu\text{m}^3$, mean \pm SD, n=17) and astrocytes located in projection layer 5a ($8.5 \times 10^4 \pm 1.6 \times 10^4 \mu\text{m}^3$, mean \pm S,D n= 13). We developed a workflow to analyze astrocyte-astrocyte interfaces in 3D, taking advantage of the color contrast to extract the frontiers between pairs of neighboring astrocytes labeled with distinct FP combinations (Fig 4c, Suppl Figs S5-S6). For each dual-color astrocyte pair (n=9), we reconstructed in 3D the surface of contact and analyzed its position and orientation relative to the cell-cell median plane given by a Voronoi tessellation based on nuclei positions. This analysis revealed frequent imbalance in the positioning of the limits of astrocyte cytoplasmic domains with respect to the median plane (mean bias parameter $75.2\% \pm 15.2$ [SD]), and showed that the tiling of the cerebral cortex by astroglial cells deviates from an equiparted Voronoi geometry. Astrocytes thus present significant heterogeneity in the volume of astrocytic domains and in their local partitioning, suggesting that they develop in a plastic rather than fixed manner and may adapt in a plastic manner to both their local environment and neighbors during cortical development and maturation.

Although complete anatomical characterization of the astroglial network is beyond the scope of the present study, these findings illustrate the unique strengths of continuous multicolor 3D imaging with Chrom-SMP microscopy for unbiased quantitative 3D analysis of cell morphology and interactions within large tissue volumes. Specific methodological advantages of Chrom-SMP for that purpose include the following: (i) the color contrast increases the throughput of individual cell analysis for a given sample by alleviating the need to use sparse labeling; (ii) it enables one to analyze interactions between cells labeled with different colors; (iii) the serial multiphoton

approach suppresses the orientation and size artefacts due to section registration or tissue shrinking/swelling encountered respectively in histology and clearing techniques.

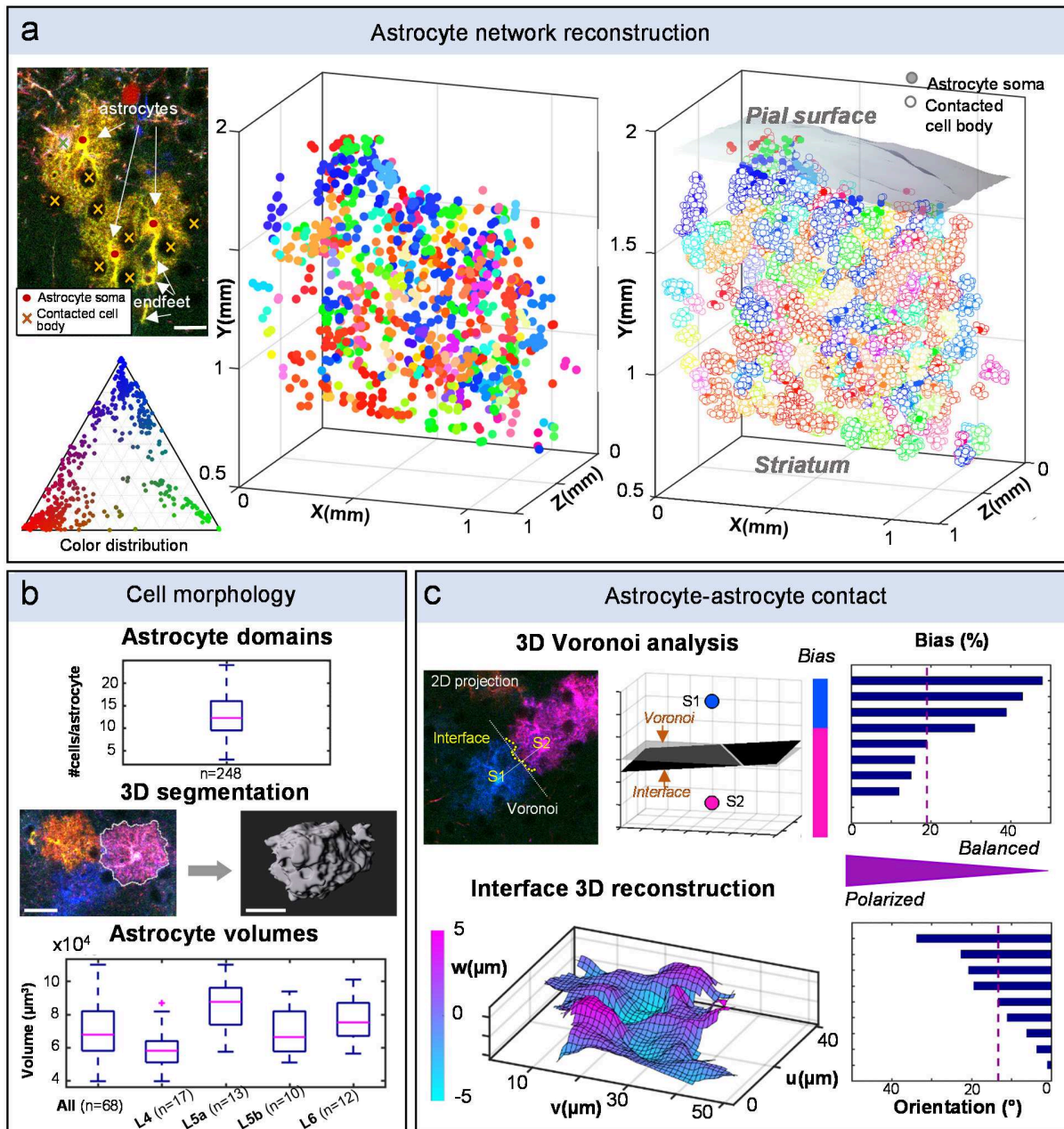


Figure 4. 3D analysis of cortical astrocyte morphology and interaction

(a) Reconstruction of labeled astrocytes and their environment in a $1.2 \times 2 \times 1 \text{ mm}^3$ subvolume of the multicolor dataset shown in Fig 3. The 3D positions of 1055 glial cells forming 261 color clusters and 12265 contacting neurons have been extracted. Color-filled markers correspond to labeled glial cells and white-filled markers to cell bodies visible in the images as negatively contrasted. (b) Parameters extracted from whole-volume analysis and astrocytes pointed in (a):

mean number of cell bodies in contact with individual astrocytes, color-based 3D segmentation giving access to the volume of the 68 segmented astrocyte domains and the volume distributions in cortical layers. Data are presented as box-and-whisker plots, central red mark representing the median value, bottom and top blue box edges indicating the 25th and 75th percentiles, whiskers extending to min and max values of non-outlier data points. Outliers are indicated as red crossmark above the boxplot. Non-parametric one-way statistical test (Kruskal-Wallis) followed by post hoc multiple comparison tests (Dunn) indicates strong significant difference between layer 4 and layer 5a distributions (adjusted p -value 0.0002) and significant difference between layer 4 and layer 6 distributions (adjusted p -value 0.0113). Scale bar: 20 μm . (c) Morphological analysis of astrocyte-astrocyte contacts. The interface is reconstructed in 3D and compared to the median position given by a Voronoi tessellation. The proportion of interface on either side of the median plane is computed (bias %) as well as the interface mean orientation ($^\circ$) relative to the median plane. See also Suppl Fig S5 and S6.

Multiplexed brain-wide mapping of neuronal projections. Interrogating the anatomical convergence and segregation of axonal projections from different sets of neurons across large distances is fundamental for gaining insight into the functional organization of the nervous system. Until now, structural and functional studies of interacting projections have mostly relied on registration of different tract-tracing datasets to a common framework^{16,28}. Yet, using distinct color labels can more precisely inform on the anatomical relationships between different tracts in the same brain volume^{8-10,21}, but a convenient approach to map these labels in 3 dimensions has been lacking. Here using Chrom-SMP microscopy, we achieved one-shot whole-brain tricolor projection tract imaging on mouse brains injected with three distinct anterograde AAV tracers (AAV-dTomato, AAV-EYFP and AAV-mTurquoise2) in three discrete locations of the sensorimotor cortex (Fig 5, Movies M8-M10). We used the whole-brain serial 2D mode of Chrom-SMP microscopy (Fig 5a,b), combined with high-resolution (0.4 μm ×0.4 μm ×1.5 μm) continuous-mode imaging of a 910×1190×300 μm^3 sub-volume within the striatum (Fig 5c). This hybrid acquisition scheme enabled us to obtain both a global map of the labeled projections and a detailed view of their axonal components in a pre-defined target region. Multicolor imaging of the three distinctly-labeled neuronal populations within the same brain provided immediate access to the relative arrangement of their projections, enabling to directly assess their topographic arrangement and spatial overlap. The dataset presented here shows the expected large-scale topography patterns, such as conserved topographic order within the callosal tract and striatum⁹, as well as core-shell topography in the thalamus¹⁰ (Fig 5a-d). In addition, a unique feature of simultaneous multicolor projection mapping is that it enables direct analysis of the local fine scale interdigitation of axonal projections from remote sites. For instance while initially segregated axons originating from the three labeled cortical areas followed global distinct trajectories in the

striatum (Fig 5b, c), the high resolution multicolor images revealed that some of them locally intermingled at the tens of microns scale (Fig 5e). To quantify these observations over the entire dataset, we developed an image analysis workflow for high-resolution segmentation (derived from ¹⁶) and multiplexed analysis of color-labeled projections from initially segregated regions (Fig 5f-i, Suppl Figs S7-S10). This enabled us to generate quantitative maps of projection strength (Fig 5h, Suppl Fig S8) which provided an estimate of the number of labeled axonal branches within a given surface (or super-pixel, set here to 24 $\mu\text{m}\times 24 \mu\text{m}$). The superimposition of projection strength maps yielded interdigitation maps that revealed the respective contribution of the labeled projections in each super-pixel (Fig 5i), and in which strong vs. weak projections could be differentially highlighted (Suppl Fig S8). This procedure enables high precision interrogation of anatomical segregation vs. convergence of color-labeled tracts at the whole brain level. Thus, Chrom-SMP imaging of multiple distinctly-labeled neuronal projections provides a unique means to assess their relative anatomical relationships at multiple scales within a single brain.

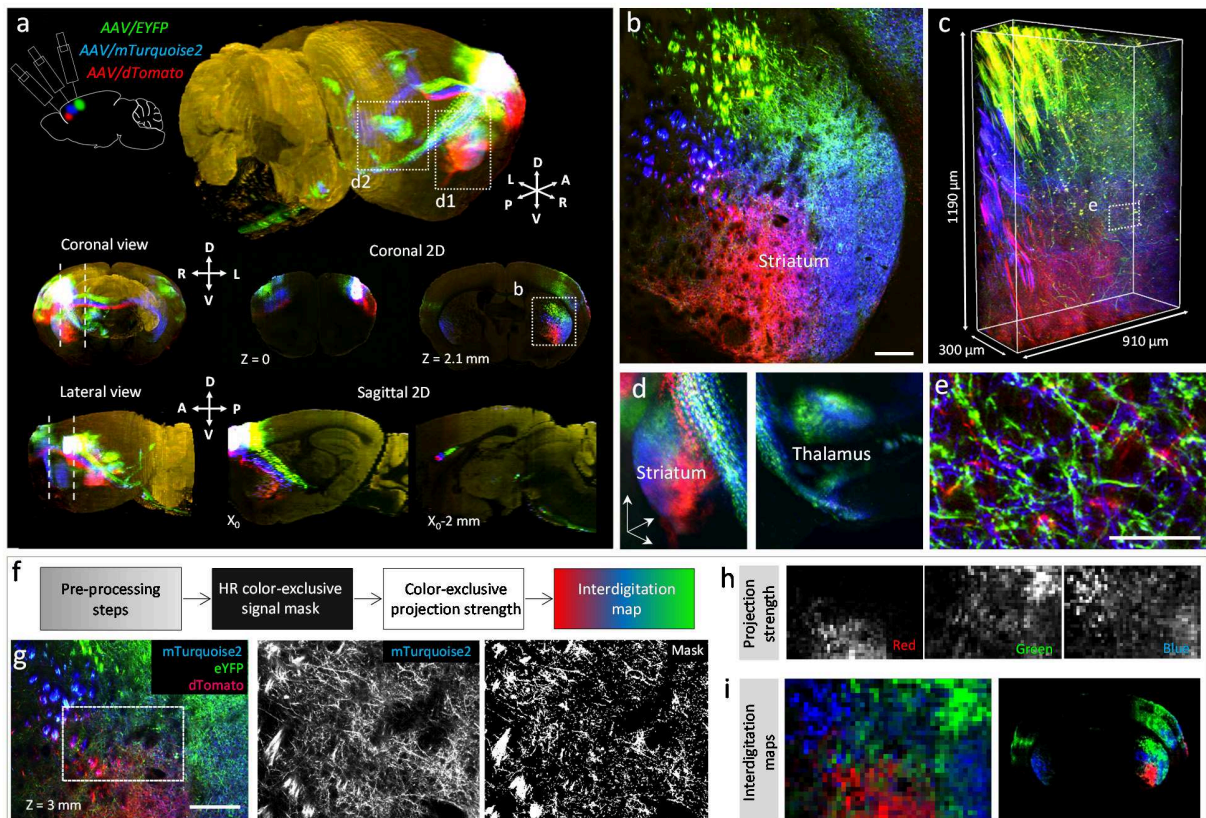


Figure 5. Brain-wide multiplexed projection mapping with Chrom-SMP

(a) Brain-wide mapping of neural projections using tricolor AAV anterograde labeling and Chrom-SMP. 3D, coronal and sagittal views of the 3 labeled projections. See also Movies M8-M10. (b) Magnification of the region boxed in (a) showing topographic arrangement of labeled projections

in the striatum. Scale bar: 200 μm . (c) Continuous high-resolution $910 \times 1190 \times 300 \mu\text{m}^3$ volume acquired with $0.4 \times 0.4 \times 1.5 \mu\text{m}^3$ voxel size in the striatum, within the brain-wide dataset. (d) 3D views extracted from the multicolor volume showing tridimensional topography patterns in target regions (striatum, thalamus) (e) Magnification of the boxed region in (c) showing intermingled axonal processes. Scale bar: 30 μm . (f-i) Multiplexed quantitative projection analysis. The general workflow is summarized in (f). See also Suppl Fig S7-S10. High-resolution binary signal masks (g) are computed for each spectrally unmixed acquisition channel to separate fluorescence signal from background. For each channel mask, pixels detected in other channels are removed to generate color exclusive binary masks. The signal ratio over non-overlapping blocks of 30×30 pixels ($24 \times 24 \mu\text{m}^2$) is then computed to generate three exclusive projection strength maps (h). Red, green and blue projection strength maps are merged into quantitative color pixels to generate quantitative color maps of interdigitation (i). Scale bar (g): 200 μm .

Label-free brain-wide micrometric morphological imaging. Finally, the Chrom-SMP system can be used to generate label-free images highlighting cytoarchitecture together with lipids and myelin distribution. Endogenous coherent contrasts such as THG and vibrational CARS have been shown to reveal morphology and lipidic/myelinated structures in brain tissue^{29–31} but cannot be used for organ-scale imaging with standard microscope configurations. Fig 6a-b presents label-free THG-CARS imaging obtained using mixed 832 / 1040 nm excitation, recorded here on a brain-wide volume for the first time. Fig 6c-d also illustrates trichromatic fluorescence imaging of viral-labeled axonal projections recorded simultaneously with label-free THG signals channel using 850 / 1100 nm excitation. This configuration is particularly informative, as the THG image complements the color-based projections with a rich morphological background, highlighting myelinated axons, fiber tracts and negatively-contrasting cell bodies.

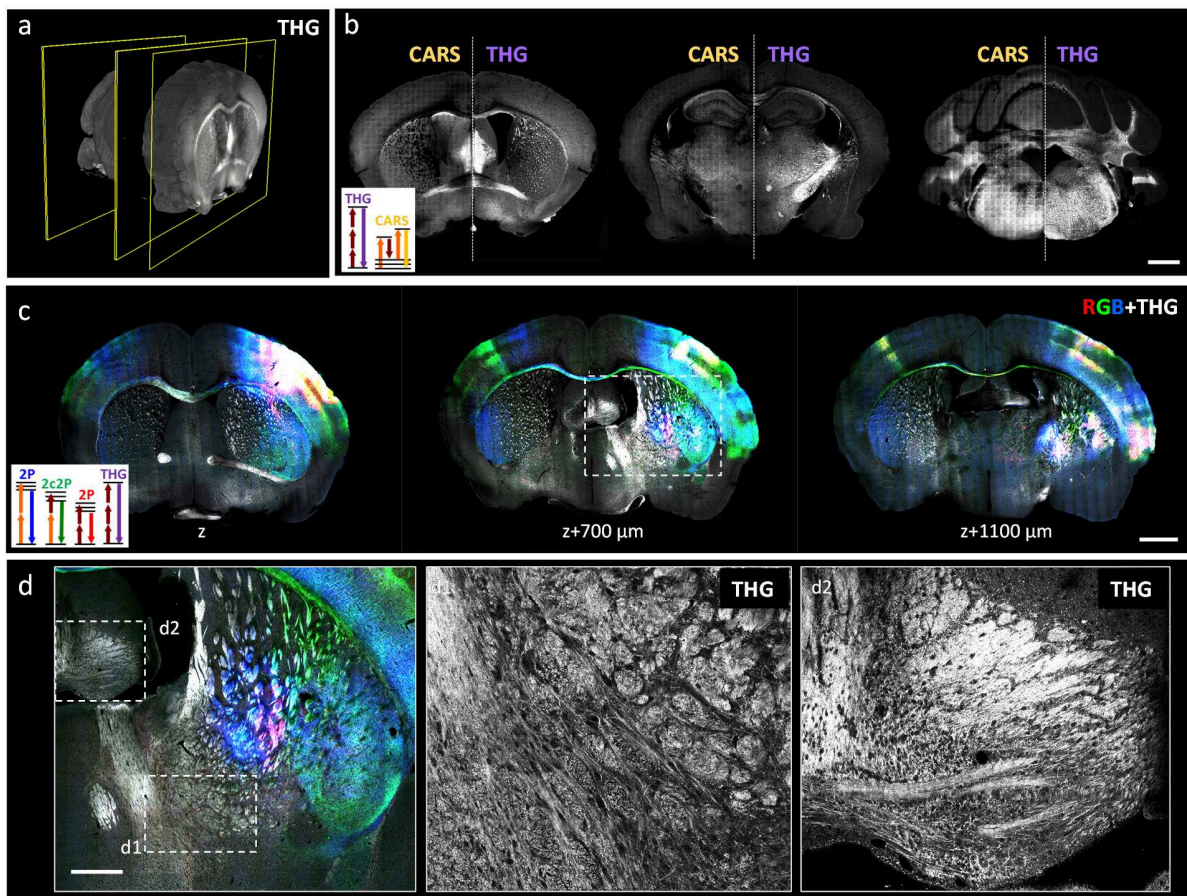


Figure 6. Brain-wide multimodal imaging using endogenous nonlinear contrasts

(a, b) Label-free THG-CARS serial imaging. (a) Coronal 3D view from the brain-wide THG channel. (b) Representative coronal sections showing combined THG/CARS images acquired with Chrom-SMP. Excitation wavelengths set to 832/1090 nm match the CH₂ stretching vibrational band at 2845 cm⁻¹ and produce CARS at 673 nm. THG from the 1090 nm beam is detected at 363 nm. Scale bar: 1 mm. (c, d) Multicolor+THG coronal sections extracted from a 8×11×5 mm³ volume using 840/1100 nm excitation. Three AAV anterograde tracers (DsRed Express, YFP, mCerulean) were injected in motor and somato-sensory cortex. (c) Overlay of multicolor (RGB) and THG (grays) 2D coronal images acquired simultaneously. Scale bar: 1mm. (d) Magnification of the boxed area in (c) shows multicolor-labeled neural projections along with morphological landmarks. THG signals highlight cytoarchitecture and lipid-rich structures (d1-d2). Scale bar: 500 μm.

Discussion

We present here a multicolor/multi-contrast tissue-scale microscopy method which bypasses the spectral limitation common to current large volume imaging techniques, and in particular expands the field of applications of serial two-photon microscopy^{15,32}.

Chrom-SMP microscopy achieves efficient one-shot excitation in three distinct spectral bands, enabling multicolor imaging of minimally processed tissue with sub-micron channel alignment and resolution preserved over cubic millimeter volumes. The integration of WM-excitation and serial block-face imaging solves two general problems encountered in tissue imaging: chromatic aberrations (inherent to all multicolor microscopy approaches) and inhomogeneous image quality across volumes. Chrom-SMP microscopy can generate brain-wide atlas-like color datasets with subcellular resolution as well as continuous 3D datasets of supra-millimetric size with submicron multicolor precision and diffraction-limited axial resolution.

Although clearing techniques such as CLARITY³³, Cubic³⁴ or iDisco³⁵ combined with light-sheet microscopy have constituted major breakthroughs in large-volume and organ-scale tissue imaging with single-cell resolution, none of the plane illumination techniques available so far was able to deliver multicolor images with high contrast in all channels together with consistent and homogeneous submicron resolution within large volumes. Multicolor high-resolution imaging of genetically labelled samples - especially red/green/blue combinations – using serial blockface imaging methods also represented a technical challenge so far. Indeed, previously reported blockface methods either relied on a single two-photon excitation wavelength which restricted contrast to dual-color red/green imaging^{10,18}, or involved tissue processing steps causing fluorescence quenching/recovery steps²¹ which were not compatible with a large palette of fluorescent proteins. This bottleneck made it particularly difficult to image combinatorically labelled tissues over depths exceeding a few hundreds of microns. In particular, the growing toolbox of multicolor labeling approaches such as Brainbow¹, Confetti³⁶, MADM³⁷, MAGIC markers³, Startrack³⁸, IfigMosaics¹¹, etc., have not yet taken full benefit from the large volume microscopy methods actively developed in the very recent years. As we have shown, these limitations are not present in the Chrom-SMP approach.

We note that one limitation of the Chrom-SMP system described here is the image acquisition time, as acquisitions over entire mouse brains currently take 2-3 days. However this caveat is neither unbreakable, nor truly limiting: imaging speed in a point-scanning approach is essentially limited by the fluorescence flux, which sets the minimal pixel dwell time. As shown in the context of monochrome serial two-photon imaging, acquisition can be significantly accelerated by using a fast scanning scheme in combination with strongly labelled samples, such as AAV-labelled tissues¹⁸. Besides, a most pressing need, common to all large volume microscopic techniques, concerns efficient workflows to handle and analyze large datasets, as image analysis time usually

exceeds by far the acquisition time. Despite its speed limitation, the current implementation of Chrom-SMP delivers previously unachievable performance for multicolor imaging.

Importantly, all applications illustrated here in the brain can also be envisioned for organ-scale studies in other tissues. The continuous imaging modality enables high-resolution anatomical reconstruction and analyses of color labeling patterns over extended volumes (in essence, 3D histology). Combined with the expanding transgenic multicolor toolbox available to label cells^{1,2,7,39}, report specific cellular events and molecular signals^{3-6,13,40} or analyze the effect of experimental perturbations^{11,12}, this work paves the way to large scale mapping of cellular networks organization, development^{3,41} and function. In the brain-wide tomography mode, Chrom-SMP imaging will facilitate mesoscale connectomics efforts, using color labels to resolve subgroups of neurons within neural projections or map putative convergence from distant brain regions^{8,10,42}. Strategies targeting specific cell-type or projections based on combined genetic drivers, reporters and viral vectors^{43,44} further expand the spectrum of our method's foreseen applications. In addition, Chrom-SMP microscopy provides label-free nonlinear contrasts *i.e.* microstructural and chemical information^{29,30} so-far inaccessible at the organ scale. Multimodal imaging relying on multicolor fluorescence and harmonics or vibrational signals may be used to develop novel pathophysiological screening modalities. Chrom-SMP will therefore be an asset for multiscale and system-level studies in neuroscience and beyond.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Anatole Chessel, Minh-Son Phan, Samuel Tozer and Josh Huang for scientific discussions and comments on the manuscript. We thank TissueVision for providing technical advice for the implementation and customization of the block-face system. We thank Polytechnique Polymedia center for 3D graphics. This work was supported by Agence Nationale de la Recherche under contracts ANR-11-EQPX-0029 (Equipex Morphoscope2), ANR-10-INBS-04 (France BioImaging) and ANR-10-LABX-65 (LabEx LifeSenses), by Université Paris-Saclay (Initiatives Doctorales Interdisciplinaires), by Fondation pour la Recherche Médicale, by Target ALS and by the European Research Council (ERC-CoG 649117).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

EB, JL, LA, KM, WS, ST, JLich designed the study.
KM, ST performed initial tests on a prototype tissue slicer.
LA, EB, PM, JMS, XS, WS implemented the Chrom-SMP imaging setup.
JL, KL, KM, SC, AB designed and implemented labeling strategies.
KL, SC, KM respectively prepared *Cytbow*-, MAGIC markers- and AAV-labeled samples.
LA performed imaging experiments with assistance from SC and analyzed the data.

IAC implemented stitching strategies.

LA, JL, EB wrote the manuscript with the assistance of all other authors.

COMPETING INTERESTS

Patent FR1250990 describes multicolor two-photon excitation by wavelength mixing.

METHODS

Tissue preparation

Multicolor transgenic mice. Mice were housed in a 14 hr light/10 hr dark cycle with free access to food, and animal procedures were carried out in accordance with institutional guidelines. Animal protocols were approved by the *Charles Darwin* animal experimentation ethical board (CEEACD/N°5). We used transgenic mice broadly expressing a *CAG-Cytbow* transgene³, modified to achieve random expression of mTurquoise2⁴⁵, mEYFP⁴⁶ or tdTomato⁴⁷ from the broadly active *CAG* promoter following Cre recombination. These mice were crossed with *B6.Cg-Tg(Nes-cre)1Kln* animals⁴⁸ and their offspring analyzed at P29. This strategy enables to trigger multicolor labels in Nestin+ progenitors descendants, including both neuronal and glial cells.

Labeling of cortical astrocytes. Cortical astroglial cells were labeled by targeting their progenitors in the dorsal telencephalon with the *MAGIC markers* strategy³. Briefly, a glass micropipette was used to inject into the lateral ventricle of E15 Swiss embryos 1 μ L of DNA mix containing the three following plasmids: *^{PB}CAG-Cytbow* (2 μ g/ μ l), in which *PiggyBac* transposition endfeet flanking a *CAG-Cytbow* cassette enable genomic integration, *CAG-hyPBase* (1 μ g/ μ l), expressing the corresponding transposase⁴⁹, and *CAG-seCre* (0.2 μ g/ μ l) which expresses a self-excisable Cre recombinase. Four 35 V pulses of 50 ms were applied with a CUY21EDIT electroporator (NepaGene) and 3 mm diameter Tweezertrodes (Sonidel Limited) positioned to target the dorsal wall of the lateral ventricle. Electroporated animals were allowed to develop until analysis at P65. This procedure efficiently labels with FP combinations the cells originating from the electroporated cortical progenitors, i.e. upper layer pyramidal neurons and later-born glial cells, mostly astrocytes.

Multiplex tract tracing with AAVs. Three topographically distinct areas within the antero-lateral sensorimotor cortex were injected with AAV2/9 encoding FPs respectively emitting in the cyan (mTurquoise2⁴⁵ or mCerulean⁵⁰, yellow (mEYFP⁴⁶) or red (tdTomato⁴⁷ or DsRed-express⁵¹ spectral range. Recombinant AAVs were based on a single-stranded (ss) AAV plasmid backbone with a CMV early enhancer/chicken β actin (CBA) promoter driving FP expression, except for DsRed-Express, driven by a CMV promoter. Detailed maps and sequences of the vectors are available upon request. Apart from the mCerulean vector, obtained from the Penn Vector Core (AV-9-PV1970), and the DsRed-Express vector generated as described in Ref⁵², all recombinant AAVs were produced by co-transfecting the corresponding vector plasmids along with packaging and helper plasmids in HEK293T cells. The AAV particles were harvested by centrifugation and dialyzed. AAV vector titers were then determined using real-time qPCR and adjusted to 0.5-5 10^{13} vg/ml by dilution in phosphate buffer saline (PBS) prior to injection. C57Bl6 female mice aged 11 weeks were anesthetized by inhalation of 2% isoflurane delivered with a constant oxygen flow (0.4 l/min). Dexamethasone (0.5 mg/kg) and ketoprofen (5 mg/kg) were administered subcutaneously for pre-emptive analgesia prior to the surgery and lidocaine (2-4 mg/kg) was applied preemptively intra-incisionally. Mice were mounted in a stereotaxic headframe (Kopf

Instruments, 940 series). Stereotactic coordinates were identified for three topographically distinct brain areas within the antero-lateral sensorimotor cortex that were respectively injected with the three AAVs. An incision was made over the scalp, three small burr holes drilled in the skull and brain surface exposed at each site. Injections were performed using the following AAVs and coordinates along the medio-lateral (ML), antero-posterior (AP) and dorso-ventral (DV) axis (defined relative to Bregma for ML and AP coordinates, and with reference to the surface of the brain for DV): in the whole brain projection mapping experiment (Fig. 3), we injected AAV2/9-CBA-tdTomato-2A-WPRE (ML 2.4 mm, right; AP +2.7 mm; DV 1 mm, $\alpha = -30^\circ$), AAV2/9-CBA-mTurq2-2A-WPRE (ML 2.4 mm, right; AP +2.2 mm; DV 1 mm, $\alpha = 0^\circ$) and AAV2/9-CBA-EYFP-2A-WPRE (ML 2.4 mm, right; AP +1.9 mm; DV 1 mm, $\alpha = -30^\circ$). For the WM and THG imaging experiment (Suppl. Fig S15), we used AAV2/9-CMV-BI-DsRed-Express-2A-WPRE (ML 2.4 mm, right; AP +2.7 mm; DV 1 mm, $\alpha = -30^\circ$); AAV2/9-CAG(CB7)-CI-mCerulean-WPRE-rBG (ML 2.5 mm, right; AP +2.3 mm; DV 0.7 mm, $\alpha = 0^\circ$) and AAV2/9-CBA-EYFP-2A-WPRE (ML 2.7 mm, right; AP +2.0 mm; DV 1 mm, $\alpha = -30^\circ$). A pulled glass pipette tip of 20–30 μm containing the AAV suspension was lowered into the brain and 300 nl was delivered at a rate of 30 nl/min using a Picospritzer (General Valve Corp) at each of the three sites; following each virus injection, the pipette was left in its location for 10 min to prevent backflow. After the injection, the incision was closed with 5/0 nylon suture thread (Ethilon Nylon Suture, Ethicon Inc. Germany), and animals were kept warm on a heating pad until complete recovery.

Chrom-SMP setup and image acquisition

Imaging was performed on a lab-built laser scanning microscope. The excitation source used was a Ti:Sapphire+OPO chain (Chameleon Ultra2 and MPX, Coherent, CA, USA). The two synchronous output beams were combined using a dichroic filter (DMSP-1000, Thorlabs) and temporally synchronized using a long-range motorized delay line (Thorlabs) placed on the OPO beam path, as described in ²². The power of the TiS and OPO beams were controlled using motorized waveplates and polarizers. In multicolor experiments, efficiency of the 2c2P virtual green excitation was independently controlled by adjusting the motorized delay line ²². Scanning was performed with galvanometric scanners (series 6215, Cambridge Technology, MA, USA). Excitation beams were focused into the sample using a water immersion objective (25x, 1.05NA, XLPLN25XWMP2, Olympus, Japan). Beam size at the rear pupil of the excitation objective and beam divergence were adjusted using two-lens telescopes, one on each beam path. To prevent photobleaching, an electronically controlled beam shutter was installed after beam recombination together with an electro-optical modulator blocking TiS excitation during laser fly-back in unidirectional scan mode.

A vibrating blade microtome (Tissue Vision, USA) was integrated into the upright microscope setup, together with long-range high-precision XYZ translation stage (Physik Instrumente, Germany/ Tissue Vision, USA) for mosaic imaging and serial z-sectioning. Scanning and acquisition were synchronized using lab-written LabVIEW software and a multichannel I/O board (PCI-6115, National Instruments, USA). Mosaic acquisition and tissue slicing were controlled by a custom version of the Orchestrator software (Tissue Vision, USA) synchronized with the acquisition software through a lab-written LabVIEW module. Signals were detected in the backward (epi) direction by photomultiplier tubes (SensTech, UK) and/or GaAsP detectors (H7422P-40, Hamamatsu, Japan) using lab-designed electronics enabling either counting or analog detection. Fluorescence and coherent signals were collected using a dichroic mirror (Semrock 751 nm, USA) and directed towards four independent detectors using dichroic mirrors (Chroma 405 nm, Semrock 521 and 561 nm). Bandpass filters were used in front of the detectors

to collect blue (Semrock 475/25), green (Semrock 547/22) and red (Semrock 607/70) light. The latter red bandpass filter was removed for CARS imaging. Third harmonic generation was collected with a dichroic (Chroma, 405 nm).

Sample mount consisted of a rotating slide holder fixed into an approximately 2 l plastic tank installed on the translating stage. The objective and vibratome arm were immersed in the PBS-filled tank during the entire duration of acquisitions.

For vibrational imaging, excitation wavelengths were set to 832/1090 nm. Otherwise, excitation wavelengths were set to 850/1100 nm. Individual tile size was 300-360 $\mu\text{m} \times 300-360 \mu\text{m}$ in multicolor experiments and 200 $\mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ in THG-CARS experiments. 10% lateral overlap was taken for mosaic reconstruction. In the tomography acquisition mode, imaging was performed typically 40 μm below the surface. In the continuous acquisition mode, 80 μm -thick stacks were acquired after each 60 μm -thick tissue section to allow 3D stitching. For robust tissue slicing, vibratome frequency was set to 60 Hz and slicing speed to 0.3-0.5 mm/s. Axial resolutions were set to 1.8 μm (TiS) and 2.6 μm (OPO) with <0.5 μm of axial mismatch. Metrology and spatial beam coalignment were done using KTP nanoparticles⁵³. Lateral sampling was set to 0.4 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ in continuous mode acquisitions and to 0.55 $\mu\text{m}/\text{pixel}$, 0.8 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ and 1.6 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ in tomography acquisitions (respectively in Chrom-SMP/Brainbow, Chrom-SMP/Triple AAV, Chrom-SMP/Endogenous experiments). Multicolor pixel dwell time was typically 5 μs .

Image processing and data analysis

Tile pre-processing and stitching. Image processing was done using Fiji⁵⁴ (NIH, USA) and Matlab (Mathworks, USA), and 3D renderings were generated using IMARIS (Bitplane, Switzerland). Individual tiles were first batch cropped to remove scanning edge artifacts. Flat-field correction was then applied to individual tiles prior to stitching to correct for illumination inhomogeneity in the field of view. Illumination profiles were computed for each channel by averaging all the tiles of the channel and applying large kernel Gaussian blurring. The tiles were then divided by the normalized (maximum intensity) illumination profiles and merged into RGB composites. Mosaic stitching was done using the Grid/Collection Stitching Fiji plugin⁵⁵. Tile positions were computed using cross-correlation between tiles. For Chrom-SMP continuous reconstructions, a custom version of the plugin was used that allowed 3D cross-correlation calculations between blocks. Of note, the high image quality provided over the entire acquisition depth by two-photon imaging permitted efficient 3D stitching without the need of a supplementary registration channel.

Linear unmixing. In order to remove spectral bleedthrough, a linear unmixing procedure was applied as follows (see Suppl Fig S5). The colorimetry of each dataset was first characterized with a pool of representative >500 regions of interest (ROIs) selected in color-labelled zones. The representative pool was plotted in a ternary color diagram and a linear transform was applied to stretch RGB values over the entire color diagram. Channel intensities were modeled as follow:

$$\begin{cases} R_{raw} = R_{corr} + a_{GR} \cdot G_{corr} + a_{BR} \cdot B_{corr} \\ G_{raw} = a_{RG} \cdot R_{corr} + G_{corr} + a_{BG} \cdot G_{corr} \\ B_{raw} = a_{RB} \cdot R_{corr} + a_{GB} \cdot G_{corr} + B_{corr} \end{cases}$$

In images of Brainbow mice (Fig 1) or MAGIC markers (Fig 2), the a_{XX} coefficients were determined using maximum red, green and blue intensity ROIs $R_{\max}(r_r, g_r, b_r)$, $G_{\max}(r_g, g_g, b_g)$, $B_{\max}(r_b, g_b, b_b)$ and by projecting the maximum blue intensity ROI to the 'pure blue' point in the

ternary diagram. The stretching coefficients were then obtained by inverting the system associated matrix. The same procedure was used for unmixing AAV-labeled datasets (Fig 3), using barycentres of the ROI distributions obtained for each AAV (red, green and blue) instead of maximas.

Astroglial network reconstruction and segmentation. Analyses of cortical astroglial cell distribution and interactions (Fig 2) were done using Fiji⁵⁴ and Matlab (Mathworks, USA). A partial rendering of the astroglial network was obtained by reconstructing 3D color-clusters of astrocytes labeled with MAGIC markers. A 3D color-cluster was defined as an ensemble of astrocytes expressing a same color combination and continuously in contact with each other (see Suppl Fig S6a). Individual astrocytes were considered as size 1 color-clusters. Within each cluster, the positions of astrocyte somata were pointed, together with the positions of negatively contrasted contacting cell bodies of 4-6 μm diameter size. Cell bodies were discriminated from transverse blood vessel sections using adjacent upper and lower slices within the z-stack. The ratio of contacted cells over labeled astrocytes was computed for all clusters, except pial clusters.

The pial surface was automatically segmented using intensity thresholding and morphometric boundaries detection. The segmented surface was then downscaled and fitted with linear interpolation for 3D visualization.

3D segmentation of individual astrocyte domains was done on isolated or color-segregated cells using IMARIS 8.4v (Bitplane, Switzerland). For each astrocyte, semi-automatic iso-intensity contours were drawn in all slices of the corresponding z-stack (see Suppl Fig S6b). When the iso-intensity contour tool did not provide accurate segmentation (low color SNR), manually defined contours were drawn. Segmented astrocytes were then classified into cortical layers based on morphological landmarks (see Suppl Fig S6c): layer 2/3 was identified by the neuronal labeling resulting from E15 electroporation⁵⁶; layer 5a was discriminated using visible projections from layer 2/3 pyramidal neurons⁵⁶; and layers 5b and 6 were discriminated based on cell density, size and distance to the corpus callosum. Only astrocytes that could be unambiguously attributed to a specific cortical layer (as defined above) were considered for layer analyses.

Statistical analysis. Statistical analysis of astrocyte volume distributions in different cortical layers was performed using GraphPad Prism software. Sample size being unequal across the 4 categories and without any assumption on the distributions, a non-parametric one-way anova test was first performed (Kruskal-Wallis), followed by a post hoc multiple comparisons test (Dunn).

Astrocytes tridimensional interface analysis. For each analyzed astrocyte pair, the interface between the two-color segregated astrocytes (A_1 , A_2) was segmented using Fiji⁵⁴ resulting in a discrete set of 3D coordinates $\{x_i, y_i, z_i\}$ in the XYZ acquisition frame. The 3D positions $\{x_{A_1}, y_{A_1}, z_{A_1}\}$ and $\{x_{A_2}, y_{A_2}, z_{A_2}\}$ of A_1 and A_2 somatas defined the Voronoi axis, $\overrightarrow{A_1A_2}$ being set as axis orientation vector. The Voronoi plane was defined as the plane perpendicular to the Voronoi axis and passing through the astrocyte pair midpoint M defined as the center of the $[A_1A_2]$ segment. Interface 3D coordinates were then expressed in the Voronoi frame and fitted with a 2D polynomial function (see Suppl Fig 7). The resulting fitting plane was defined as the interface plane. The angle between the Voronoi plane and the interface plane was computed (orientation parameter) together with the ratio of interface points above the Voronoi plane (bias parameter). The interface plane and a corresponding normal vector were used to define the interface frame. 3D interface coordinates were in turn expressed in the interface frame and fitted with a biharmonic surface model. Interfaces were then semi-automatically detoured and amplitude and gradient maps were generated. All interface computations were done using Matlab (Mathworks, USA).

Quantitative topography with triple-AAV projection labeling. A pipeline for quantifying neuronal projection color maps was adapted from previously published methods designed for serial two-photon microscopy-based monochrome image analysis^{15,16,19}. After spectral unmixing, fluorescence signal was separated from background for each channel. Square root transform followed by histogram matching was applied to intensity images for contrast enhancement and standardization prior to segmentation. Fluorescence signal was then separated from background using an intensity-based clustering algorithm (multi-Otsu)⁵⁷ combined with connected component labeling (see Suppl Fig S7). Passing fibers were not distinguished from terminals. For each channel, the segmented binary mask was transformed into a color-exclusive mask by excluding signal pixels shared with other channels. Color-exclusive projection strength maps were then generated by computing the ratio of signal pixels over background in 30x30 pixel size non-overlapping adjacent super-pixels. Finally, red, green and blue projection strength maps were combined onto RGB interdigitation maps (see Suppl Fig S8). Projection strength maps were generated together with confidence maps to account for quantification errors due to multi-channel pixel exclusion. Confidence maps were computed as the ratio of exclusive signal pixels over the total number of signal pixels in the 30x30 pixel size super-pixels (see Suppl Fig S9). This workflow was implemented using custom-written Matlab (Mathworks, USA) scripts and Fiji⁵⁴ (NIH, USA).

Code availability statement

Custom code used for data analysis and image processing pipeline is available upon request

Data availability statement

Reconstructed brain-wide and cortical datasets will be publicly available as resource datasets.

Raw unprocessed data is available upon request.

REFERENCES

1. Livet, J. *et al.* Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* **450**, 56–62 (2007).
2. Almeida, A. D. *et al.* Spectrum of Fates: a new approach to the study of the developing zebrafish retina. *Development* **141**, 1971–1980 (2014).
3. Loulier, K. *et al.* Multiplex Cell and Lineage Tracking with Combinatorial Labels. *Neuron* **81**, (2014).
4. Snippert, H. J. *et al.* Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell* **143**, 134–144 (2010).
5. Bajar, B. T. *et al.* Fluorescent indicators for simultaneous reporting of all four cell cycle phases. *Nat. Methods* **13**, 993–996 (2016).
6. Kim, E. J., Jacobs, M. W., Ito-Cole, T. & Callaway, E. M. Improved Monosynaptic Neural Circuit Tracing Using Engineered Rabies Virus Glycoproteins. *Cell Rep.* **15**, 692–699 (2016).
7. Hammer, S., Monavarfeshani, A., Lemon, T., Su, J. & Fox, M. A. Multiple Retinal Axons Converge onto Relay Cells in the Adult Mouse Thalamus. *Cell Rep.* **12**, 1575–1583 (2015).
8. Tsuruel, S., Gudes, S., Draft, R. W., Binshtok, A. M. & Lichtman, J. W. Multispectral labeling technique to map many neighboring axonal projections in the same tissue. *Nat. Methods* **12**, 547–552 (2015).
9. Zhou, J. *et al.* Axon position within the corpus callosum determines contralateral cortical projection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E2714-23 (2013).
10. Jeong, M. *et al.* Comparative three-dimensional connectome map of motor cortical projections in the mouse brain. *Sci. Rep.* **6**, 20072 (2016).
11. Pontes-Quero, S. *et al.* Dual ifgMosaic: A Versatile Method for Multispectral and Combinatorial Mosaic Gene-Function Analysis. *Cell* **170**, 800–814.e18 (2017).
12. Beattie, R. *et al.* Mosaic Analysis with Double Markers Reveals Distinct Sequential Functions of Lgl1 in Neural Stem Cells. *Neuron* **94**, 517–533.e3 (2017).
13. Regot, S., Hughey, J. J., Bajar, B. T., Carrasco, S. & Covert, M. W. High-sensitivity measurements of multiple kinase activities in live single cells. *Cell* **157**, 1724–1734 (2014).
14. Ragan, T. *et al.* High-resolution whole organ imaging using two-photon tissue cytometry. *J. Biomed. Opt.* **12**, 14015 (2007).
15. Ragan, T. *et al.* Serial two-photon tomography: an automated method for ex-vivo mouse brain imaging. *Nat. Methods* **9**, 255–258 (2012).
16. Oh, S. W. *et al.* A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature* **508**, 207–214 (2014).
17. Li, A. *et al.* Micro-optical sectioning tomography to obtain a high-resolution atlas of the

- mouse brain. *Science* (80-.). **330**, 1404–1408 (2010).
18. Economo, M. N. *et al.* A platform for brain-wide imaging and reconstruction of individual neurons. *Elife* **5**, 1–22 (2016).
 19. Vélez-Fort, M. *et al.* The stimulus selectivity and connectivity of layer six principal cells reveals cortical microcircuits underlying visual processing. *Neuron* **83**, 1431–1443 (2014).
 20. Zapiec, B. & Mombaerts, P. Multiplex assessment of the positions of odorant receptor-specific glomeruli in the mouse olfactory bulb by serial two-photon tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201512135 (2015). doi:10.1073/pnas.1512135112
 21. Gong, H. *et al.* High-throughput dual-colour precision imaging for brain-wide connectome with cytoarchitectonic landmarks at the cellular level. *Nat. Commun.* **7**, 12142 (2016).
 22. Mahou, P. *et al.* Multicolor two-photon tissue imaging by wavelength mixing. *Nat. Methods* **9**, (2012).
 23. Débarre, D. *et al.* Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy. *Nat. Methods* **3**, (2006).
 24. Cheng, J.-X. & Xie, X. S. Vibrational spectroscopic imaging of living systems: An emerging platform for biology and medicine. *Science* (80-.). **350**, aaa8870-aaa8870 (2015).
 25. Mahou, P. *et al.* Metrology of multiphoton microscopes using second harmonic generation nanoprobes. *Small* **13**, (2017).
 26. Bushong, E. A., Martone, M. E. & Ellisman, M. H. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int. J. Dev. Neurosci.* **22**, 73–86 (2004).
 27. Ge, W.-P., Miyawaki, A., Gage, F. H., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex. *Nature* **484**, 376–380 (2012).
 28. Mailly, P., Aliane, V., Groenewegen, H. J., Haber, S. N. & Deniau, J.-M. The Rat Prefrontostriatal System Analyzed in 3D: Evidence for Multiple Interacting Functional Units. *J. Neurosci.* **33**, 5718–5727 (2013).
 29. Fu, Y., Huff, T. B., Wang, H.-W., Wang, H. & Cheng, J.-X. Ex vivo and in vivo imaging of myelin fibers in mouse brain by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Opt Express* **16**, 19396–19409 (2008).
 30. Farrar, M. J., Wise, F. W., Fetcho, J. R. & Schaffer, C. B. In vivo imaging of myelin in the vertebrate central nervous system using third harmonic generation microscopy. *Biophys. J.* **100**, 1362–1371 (2011).
 31. Witte, S. *et al.* Label-free live brain imaging and targeted patching with third-harmonic generation microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 5970–5975 (2011).
 32. Gong, H. *et al.* Continuously tracing brain-wide long-distance axonal projections in mice at a one-micron voxel resolution. *Neuroimage* **74**, 87–98 (2013).
 33. Chung, K. & Deisseroth, K. CLARITY for mapping the nervous system. *Nat. Methods* **10**, 508–513 (2013).
 34. Susaki, E. A. *et al.* Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical

- cocktails and computational analysis. *Cell* **157**, 726–739 (2014).
35. Renier, N. *et al.* IDISCO: A simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* **159**, 896–910 (2014).
 36. Tay, T. L. *et al.* A new fate mapping system reveals context-dependent random or clonal expansion of microglia. *Nat. Neurosci.* **20**, 793–803 (2017).
 37. Zong, H., Espinosa, J. S., Su, H. H., Muzumdar, M. D. & Luo, L. Mosaic analysis with double markers in mice. *Cell* **121**, 479–492 (2005).
 38. Figueres-Oñate, M., García-Marqués, J. & López-Mascaraque, L. UbC-StarTrack, a clonal method to target the entire progeny of individual progenitors. *Sci. Rep.* **6**, 33896 (2016).
 39. Cai, D., Cohen, K. B., Luo, T., Lichtman, J. W. & Sanes, J. R. Improved tools for the Brainbow toolbox. *Nat. Methods* **10**, 540–547 (2013).
 40. Wollny, D. *et al.* Single-Cell Analysis Uncovers Clonal Acinar Cell Heterogeneity in the Adult Pancreas. *Dev. Cell* **39**, 289–301 (2016).
 41. Weissman, T. a. & Pan, Y. a. Brainbow: New Resources and Emerging Biological Applications for Multicolor Genetic Labeling and Analysis. *Genetics* **199**, 293–306 (2015).
 42. Hintiryan, H. *et al.* The mouse cortico-striatal projectome. *Nat. Neurosci.* **19**, 1–19 (2016).
 43. Gerfen, C. R., Paletzki, R. & Heintz, N. GENSAT BAC cre-recombinase driver lines to study the functional organization of cerebral cortical and basal ganglia circuits. *Neuron* **80**, 1368–1383 (2013).
 44. He, M. *et al.* Strategies and Tools for Combinatorial Targeting of GABAergic Neurons in Mouse Cerebral Cortex. *Neuron* 1–16 (2016). doi:10.1016/j.neuron.2016.08.021
 45. Goedhart, J. *et al.* Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat. Commun.* **3**, 751 (2012).
 46. Zacharias, D. A. Partitioning of Lipid-Modified Monomeric GFPs into Membrane Microdomains of Live Cells. *Science (80-.)*. **296**, 913–916 (2002).
 47. Shaner, N. C. *et al.* Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1567–1572 (2004).
 48. Tronche, F. *et al.* Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat. Genet.* **23**, 99–103 (1999).
 49. Yusa, K., Zhou, L., Li, M. A., Bradley, A. & Craig, N. L. A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 1531–1536 (2011).
 50. Rizzo, M. A., Springer, G. H., Granada, B. & Piston, D. W. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat. Biotechnol.* **22**, 445–449 (2004).
 51. Bevis, B. J. & Glick, B. S. Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nat. Biotechnol.* **20**, 83–7 (2002).
 52. Kuhlman, S. J. & Huang, Z. J. High-resolution labeling and functional manipulation of specific neuron types in mouse brain by Cre-activated viral gene expression. *PLoS One*

- 3**, (2008).
53. Mahou, P. *et al.* Metrology of Multiphoton Microscopes Using Second Harmonic Generation Nanoprobes. *Small* **13**, (2017).
 54. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
 55. Preibisch, S., Saalfeld, S. & Tomancak, P. Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics* **25**, 1463–1465 (2009).
 56. Wang, C.-L. *et al.* Activity-Dependent Development of Callosal Projections in the Somatosensory Cortex. *J. Neurosci.* **27**, 11334–11342 (2007).
 57. Liao, P. S., Chen, T. S. & Chung, P. C. A fast algorithm for multilevel thresholding. *J. Inf. Sci. Eng.* **17**, 713–727 (2001).

Supplementary information for:

Multicolor multiscale brain imaging with chromatic serial multiphoton microscopy

Abdeladim et al

Supplementary Figures

- **Figure S1:** High-resolution multicolor anatomical views with Chrom-SMP
- **Figure S2:** Pre-processing steps for combinatorial multicolor data
- **Figure S3:** Examples of detected color combinations
- **Figure S4:** Anatomical annotations and cell classification in high-resolution 3D volumes
- **Figure S5:** Astrocyte-astrocyte contact processing workflow
- **Figure S6:** Astrocyte-astrocyte contact analysis
- **Figure S7:** High-resolution fluorescence signal segmentation
- **Figure S9:** Quantitative topography analysis workflow
- **Figure S9:** Exclusive projection confidence maps
- **Figure S10:** Neural projection dissection with Chrom-SMP

Supplementary Movies

- **Movie S1 :** Principles of Chrom-SMP
- **Movie S2 :** Whole-Brain multicolor imaging with Chrom-SMP
- **Movie S3 :** Whole-Brainbow mouse brain acquired with Chrom-SMP
- **Movie S4 :** High-resolution multicolor anatomical map in the olfactory bulb
- **Movie S5 :** High-resolution multicolor anatomical map in the cerebellum
- **Movie S6:** Multicolor 3D continuous imaging with preserved contrast and resolution over arbitrary depth
- **Movie S7:** 3D multicolor morphological imaging of astrocyte arboritic domains and neuronal processes over arbitrary depth.
- **Movie S8 :** Brain-wide 3D projection topography
- **Movie S9 :** Brain-wide multiplex projection mapping
- **Movie S10 :** High-resolution multiplexed connectivity imaging

Movie S1 : Principles of Chrom-SMP

Principles of the wavelength-mixing trichromatic acquisition scheme combined with serial sectioning to achieve whole-brain multicolor imaging.

Movie S2 : Whole-Brain multicolor imaging with Chrom-SMP

3D rendering of an entire *Cytbow* mouse brain acquired with Chrom-SMP. Chrom-SMP 2D brain images were downsampled by factor of 10.

Movie S3 : Whole-Brainbow mouse brain acquired with Chrom-SMP

92 coronal section dataset showing 3D reconstruction of the *Cytbow* mouse brain. Chrom-SMP 2D brain images were downsampled by factor of 10.

Movie S4 : High-resolution multicolor anatomical map in the olfactory bulb

2D Chrom-SMP section in the olfactory bulb at $0.55\mu\text{m}\times 0.55\mu\text{m}$ multicolor pixel precision, from the *Cytbow* mouse brain dataset.

Movie S5 : High-resolution multicolor anatomical map in the cerebellum

2D Chrom-SMP section in the cerebellum at $0.55\mu\text{m}\times 0.55\mu\text{m}$ multicolor pixel precision, from the *Cytbow* mouse brain dataset.

Movie S6: Multicolor 3D continuous imaging with preserved contrast and resolution over arbitrary depth

Multicolor Chrom-SMP 3D micrometric imaging of a $1.2\times 2\times 2\text{ mm}^3$ volume of mouse cerebral cortex labeled with *MAGIC Markers* with $0.4\mu\text{m}\times 0.4\mu\text{m}\times 1.5\mu\text{m}$ voxel size. Resolution, contrast and channel-registration are preserved through the entire dataset.

Movie S7: 3D multicolor morphological imaging of astrocyte arboritic domains and neuronal processes over arbitrary depth.

3D rendering of glial and neuronal processes with a $0.4\mu\text{m}\times 0.4\mu\text{m}\times 1.5\mu\text{m}$ multicolor voxel size precision in the color-labeled *MAGIC Markers* cerebral cortex volume.

Movie S8 : Brain-wide 3D projection topography

3D rendering of the *triple-AAV* labeled mouse brain showing multiplexed projection tract imaging. Chrom-SMP 2D brain images were downsampled by factor of 10.

Movie S9 : Brain-wide multiplex projection mapping

82 coronal section dataset showing 3D reconstruction of the *triple-AAV* mouse brain. Chrom-SMP 2D brain images were downsampled by factor of 10.

Movie S10 : High-resolution multiplexed connectivity imaging

2D Chrom-SMP section in the forebrain at $0.8\mu\text{m}\times 0.8\mu\text{m}$ multicolor pixel precision, from the *triple-AAV* mouse brain dataset showing projection interdigitation.

Figure S1 | High-resolution multicolor anatomical views with Chrom-SMP

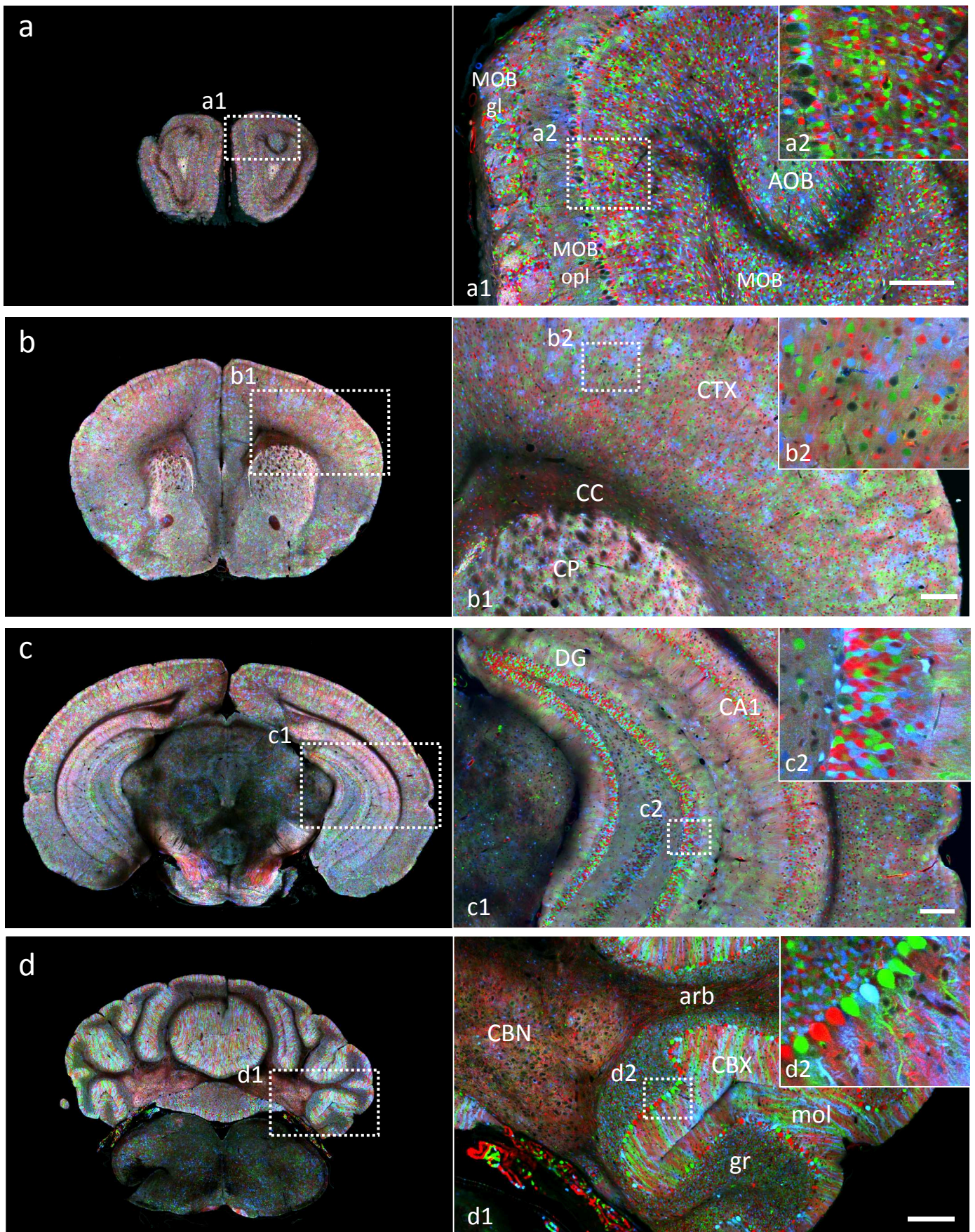
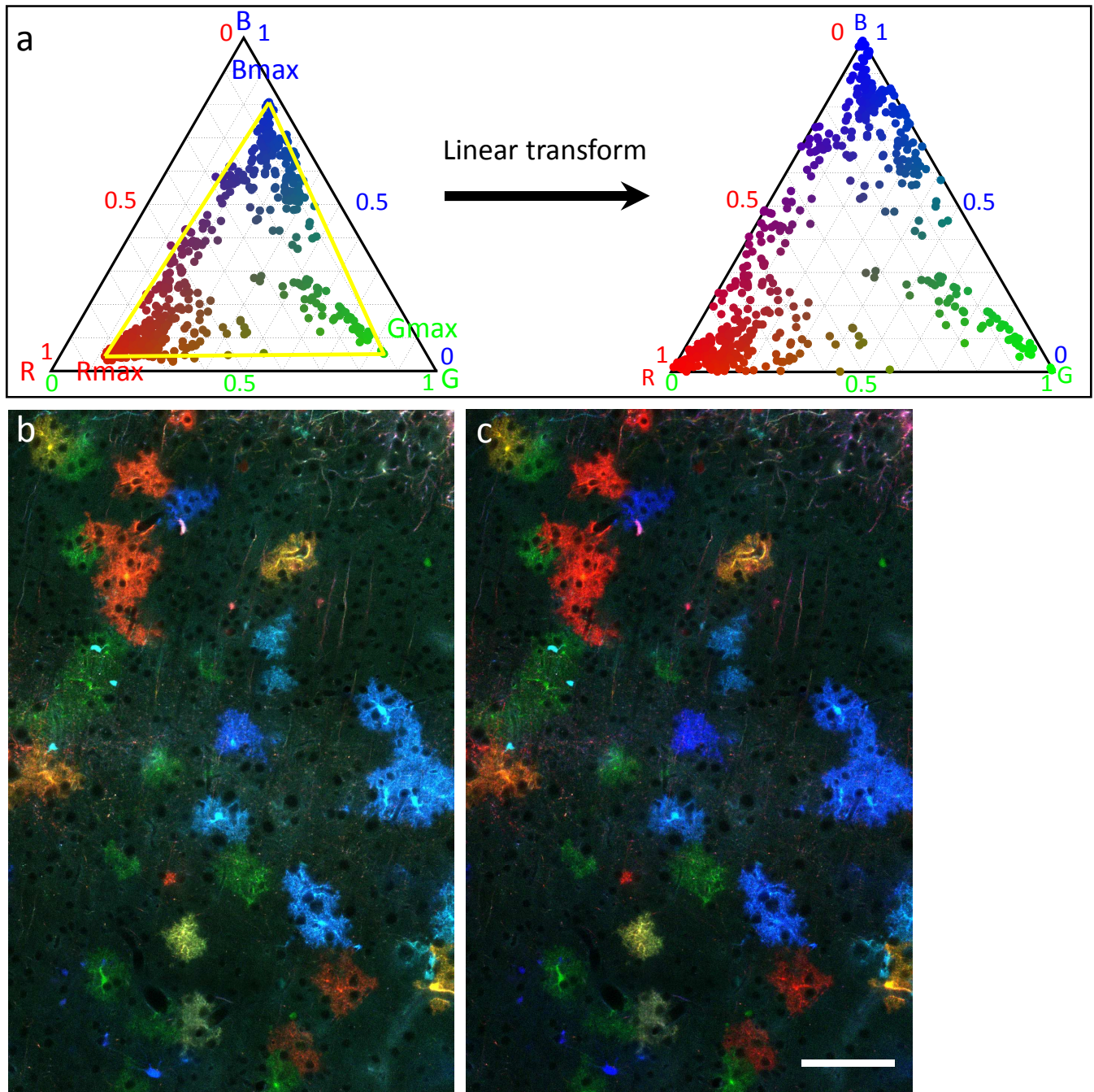
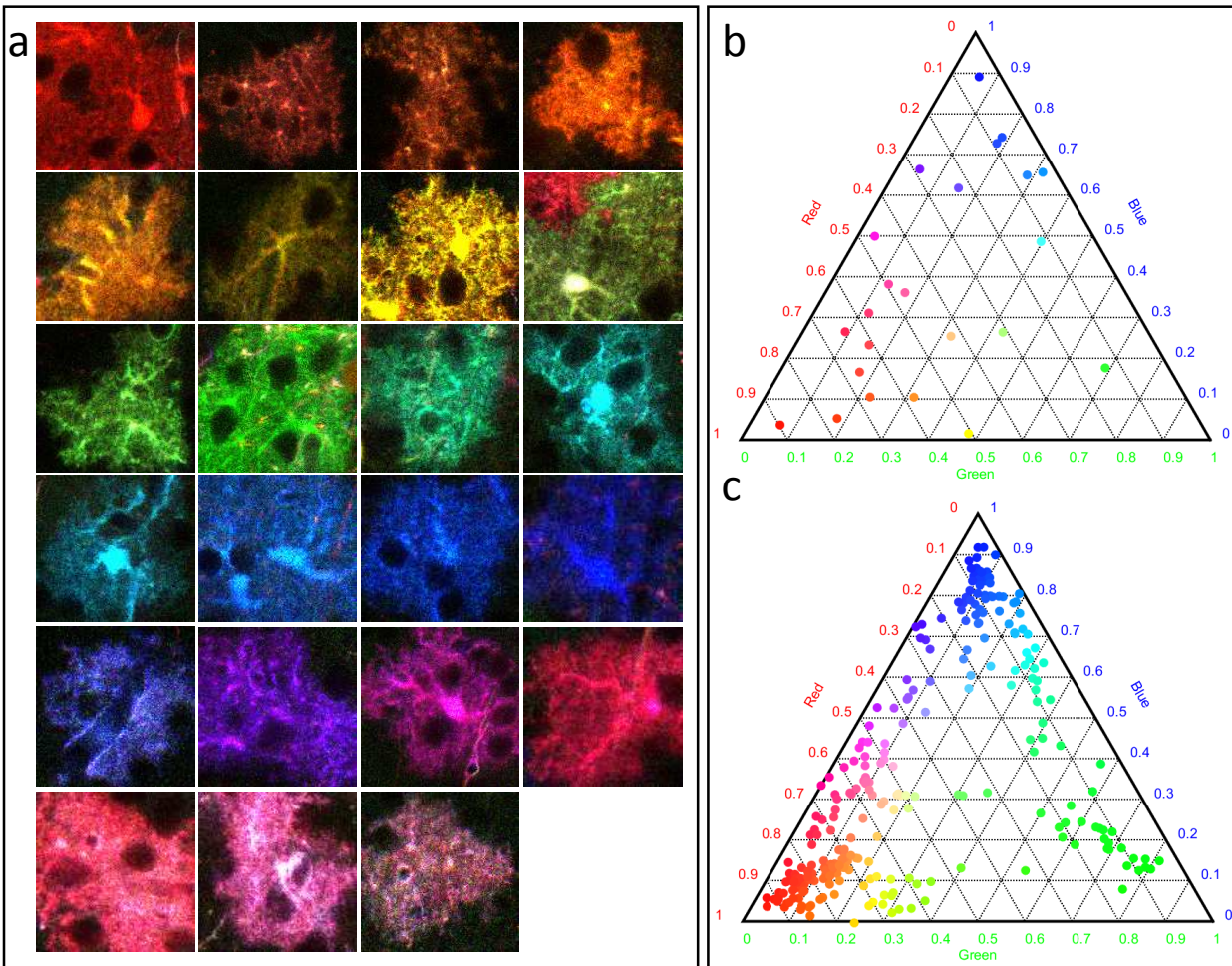


Figure S2 | Pre-processing steps for combinatorial multicolor data



(a) Ternary color diagrams before (left) and after (right) color processing. Color processing consists of applying a linear transform to uniformly stretch the $R_{max}G_{max}B_{max}$ triangle in the color space so that B_{max} is projected to the 'pure blue' (0,0,1) position while maintaining the RGB color ratio. (b-c) Brainbow labeled cortical glial cells before (b) and after (c) color processing. Scale bar : 100 μ m.

Figure S3 | Examples of detected color combinations



(a) Examples of 23 astrocytes labelled with distinct color combinations detected in the $1.2 \times 2 \times 2$ mm³ volume presented in Fig 3. Shown are crops from the original dataset preprocessed as explained in Fig S2. (b) Positions of these 23 clusters in a ternary color plot. (c) Colorimetric positions of the 261 astrocytes clusters detected in the imaged volume.

Figure S4 | Anatomical annotations and cell classification in high-resolution 3D volumes

(a) Left : Astrocytes from the same color-cluster. A color-cluster is defined as an ensemble of astrocytes expressing the same color combination and continuously in contact with each other. Both somata included within astrocytic domains and contacted at the astrocytes periphery were considered for the astroglial network reconstruction. Right : 3D positions and color-labels of analysed astrocytes. (b) Individual astrocyte segmentation. 2D cell contours are traced in each plane of the corresponding z-stack and a 3D surface is generated by interpolating all the successive 2D contours. (c) Morphological criteria used for cortical layer identification. Layers 2/3 are identified by the presence of labeled neurons from in utero electroporation at E15 (c0). Layer 5a, is identified by the presence of visible projections from upper layers pyramidal neurons (c2). Layer 4 astrocytes included in cortical layer analysis were mostly located in the lower layer 4 region, with smaller and densely packed cell bodies (c1). Layers 5b and 6 were discriminated based on cell size and density (c3-c4) and distance to corpus callosum. Scale bar : 100 μ m.

Figure S4 | Anatomical annotations and cell classification in high-resolution 3D volumes

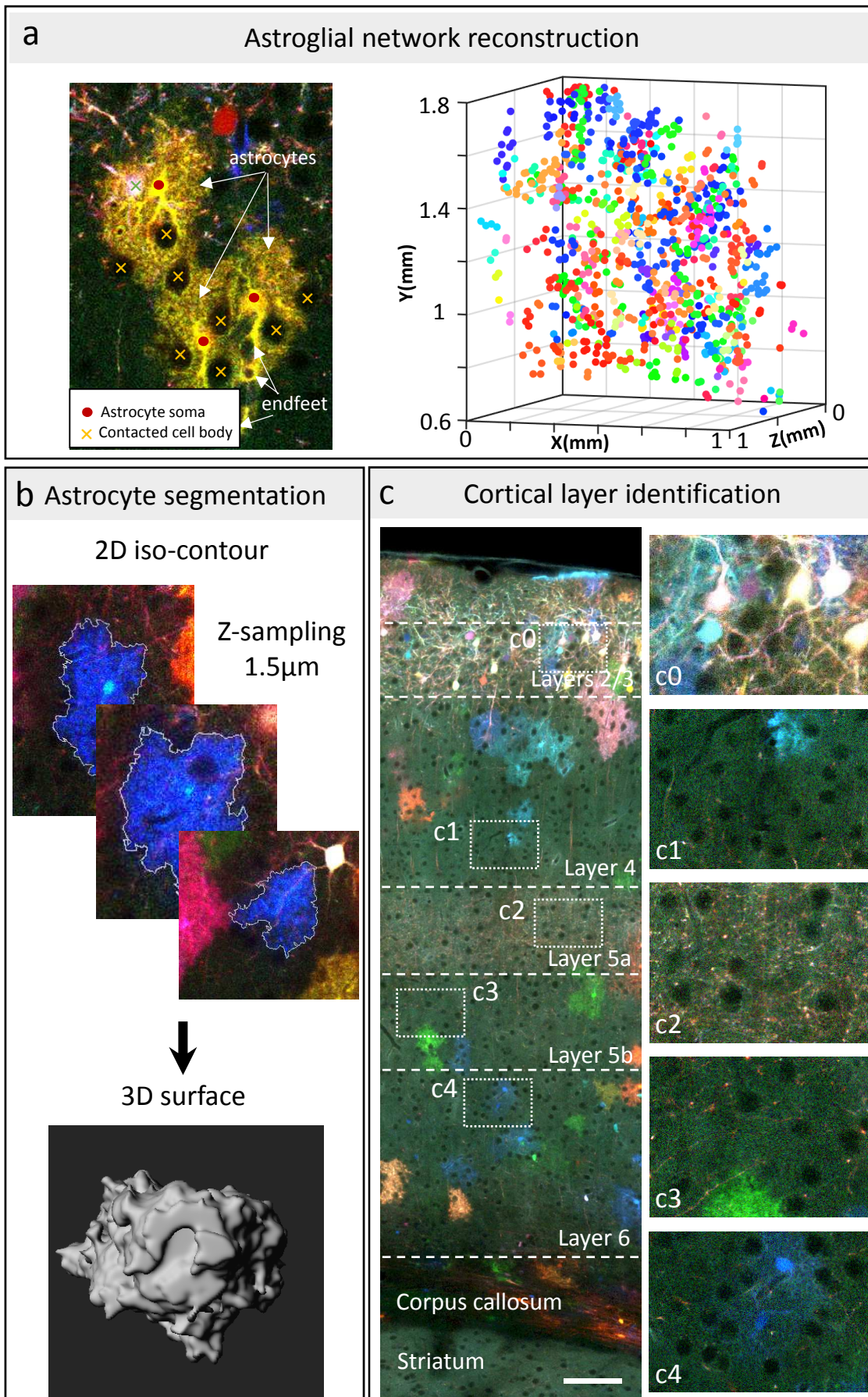
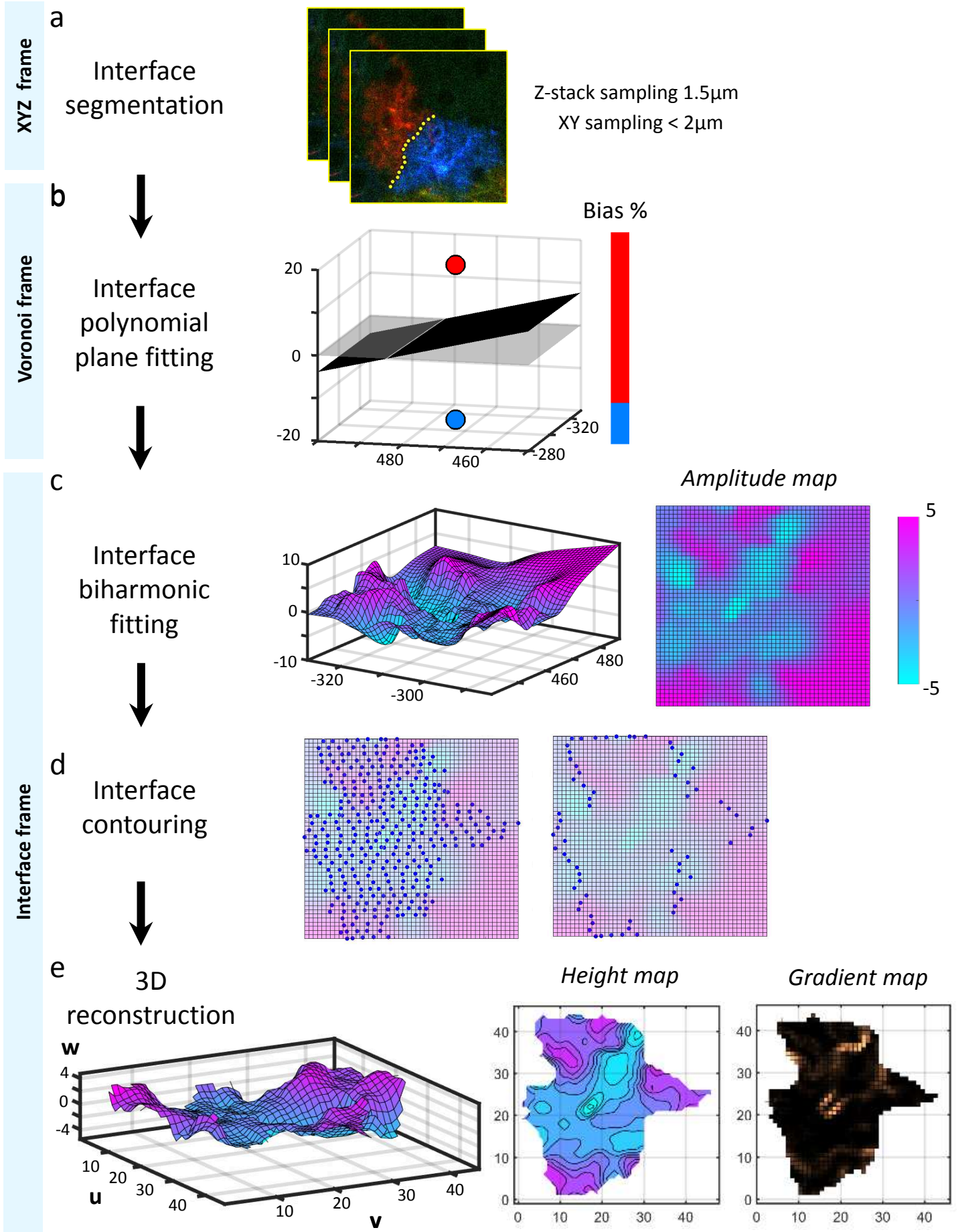


Figure S5 | Astrocyte-astrocyte contact processing workflow

(a) Interface segmentation of color-segregated astrocyte pair. (b) Interface representation in the Voronoi frame. In grey : Voronoi plane. In black: interface plane. Binary color bar represents the bias parameter (ratio of interface points above the Voronoi plane). (c) 3D Surface fitting in the interface frame Sampling : $1\mu\text{m}\times 1\mu\text{m}$. (d) Projection of interface points onto the interface plane (left). Contour points are defined as the most distant points on each interface z-stack plane (right). (e) 3D interface reconstruction and derived height and gradient maps. 3x3 median filtering is applied on the $1\mu\text{m}\times 1\mu\text{m}$ surface fit to generate the height map. Black lines on the height map represent altitude isolines referenced to the interface plane. Gradient map is computed as

$$\frac{\partial w}{\partial u} \cdot \frac{\partial w}{\partial u} + \frac{\partial w}{\partial v} \cdot \frac{\partial w}{\partial v} . \text{ Axis units : } \mu\text{m}$$

Figure S5 | Astrocyte-astrocyte contact processing workflow



Supplementary Figure 6 | Astrocyte-astrocyte contact analysis

Inventory of analysed astrocyte color pairs. *Orientation*: angle between the Voronoi plane and the interface plane in the Voronoi frame. *Bias*: Ratio of interface points above the Voronoi plane. *Distance*: distance between the two astrocyte somata. *Surface*: interface area. *MSD*: mean square distance parameter computed as the total sum of square amplitudes divided by the interface area. *Wigginess*: total sum of the gradient parameter (as defined in supplementary figure 6) divided by the restricted interface area. Restricted interface area is defined as the interface area with a finite gradient parameter value i.e borders of the interface area are excluded.

Figure S6 | Astrocyte-astrocyte contact analysis

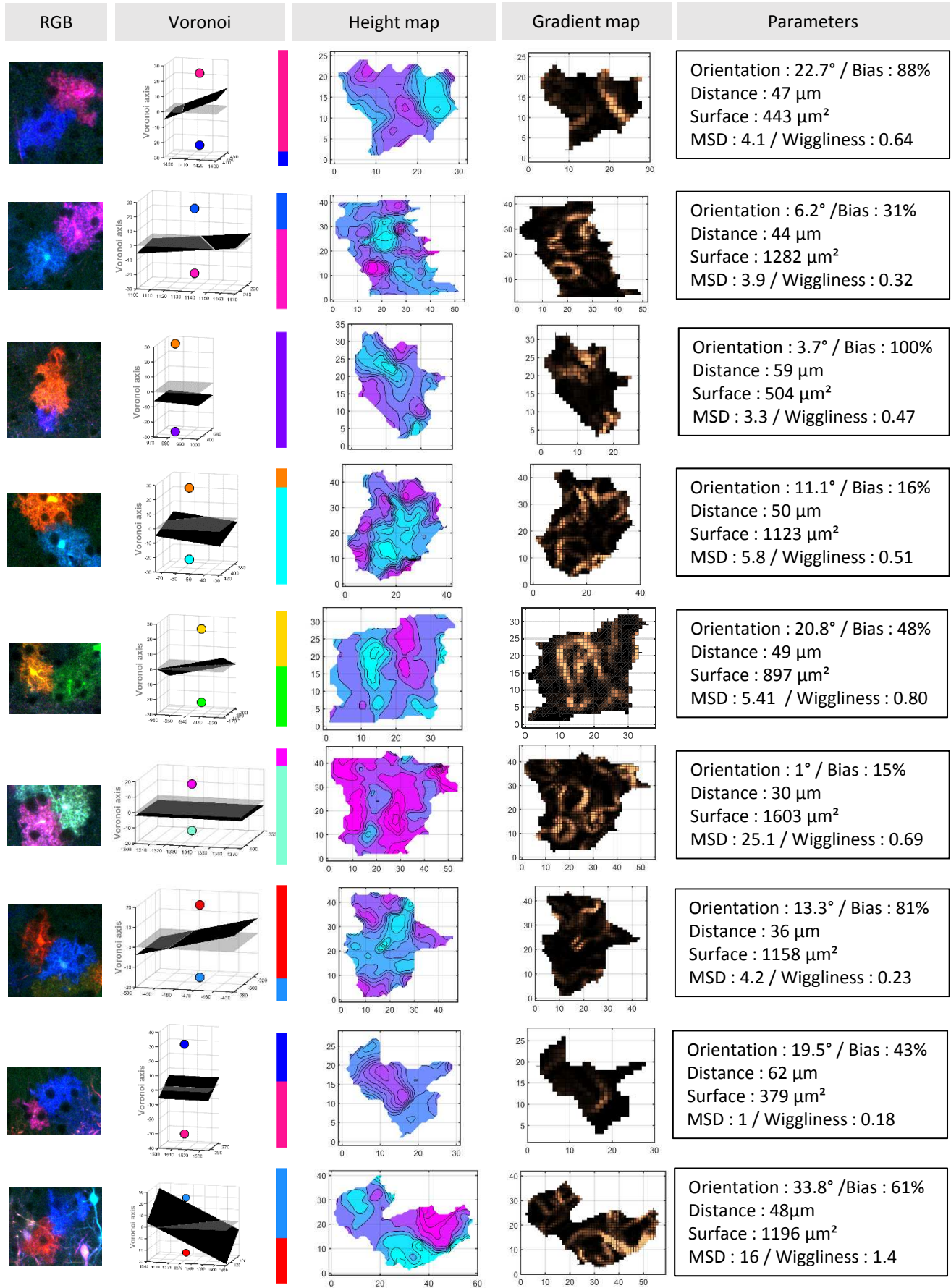
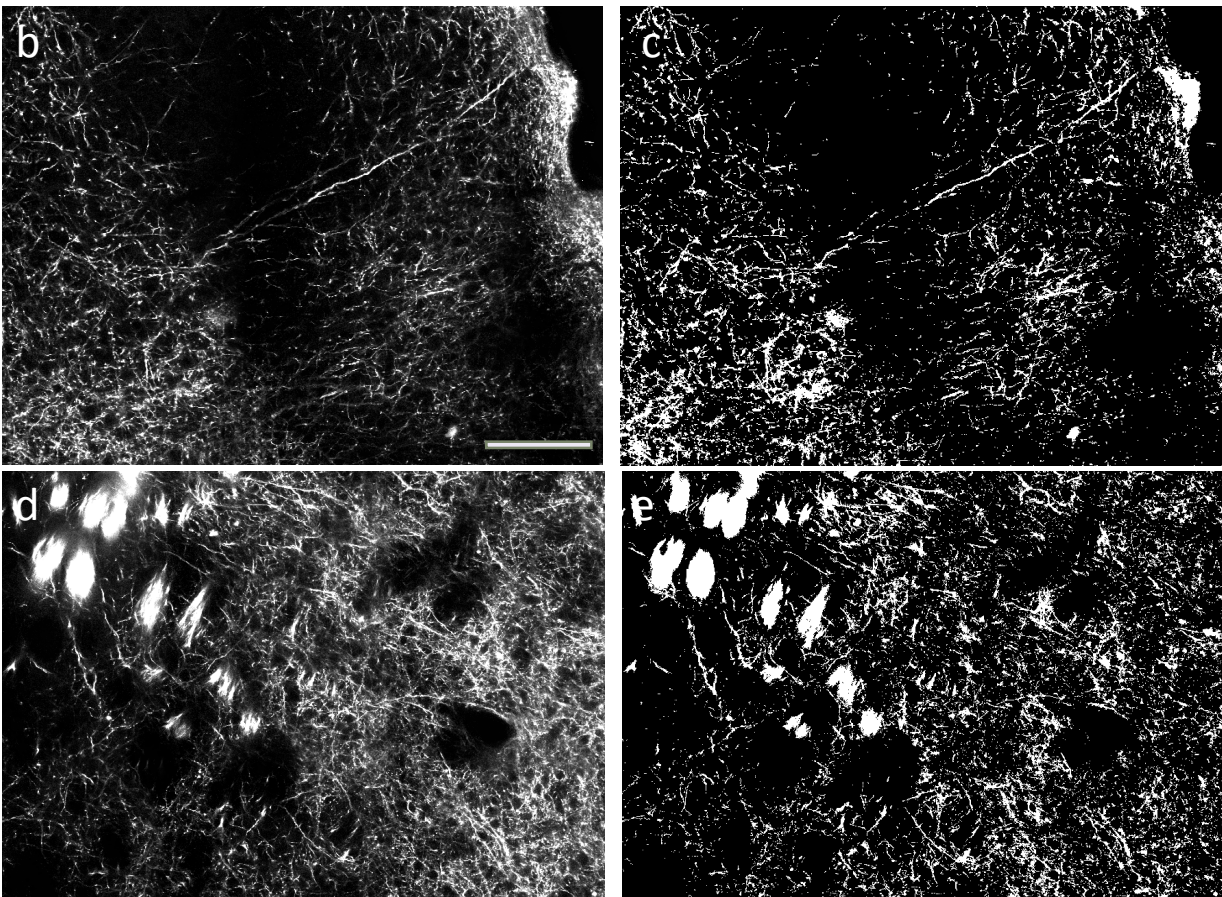
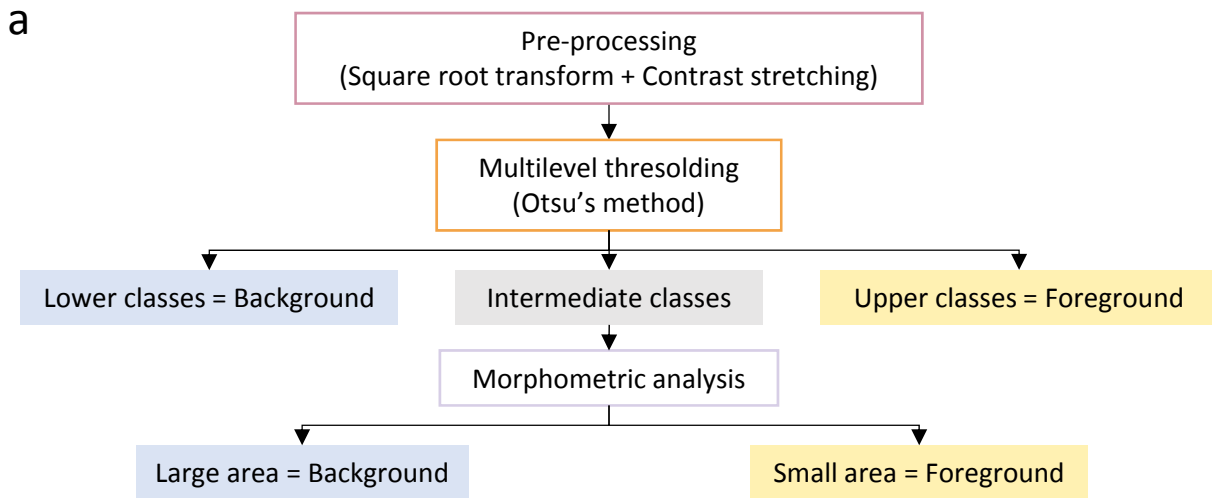


Figure S7 | High-resolution fluorescence signal segmentation



(a) Segmentation algorithm layout. Fluorescence is separated from background using intensity-based clustering combined with morphometric analysis. b-e) Single-channel images from multiplexed connectivity dataset (left) and corresponding fluorescence binary masks (right). Scale bar : 200 μ m.

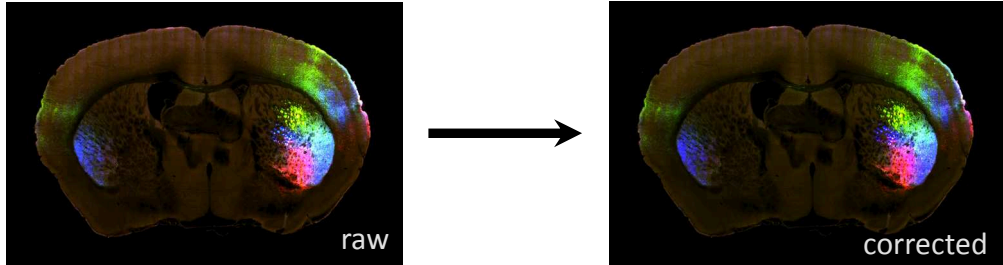
Figure S8 | Quantitative topography analysis workflow

Summary of processing steps for multiplexed connectivity analysis. Pre-processing steps consist of flat-field correction of individual tiles followed by stitching. Spectral unmixing is performed by applying a linear transform in the color space with barycentric initial conditions (see Methods). The segmentation algorithm (presented in supplementary figure 8) generates high-resolution fluorescence binary masks. Positive pixels from each color-exclusive binary mask are summed over $24\mu\text{m} \times 24\mu\text{m}$ (i.e. 30×30 pixels) to compute projection strength maps. Projection maps are then merged into quantitative interdigitation maps. Color maps displayed in regular contrast (top) allows for direct visualization of interdigitation from high projection strength areas. Heptachromic (bottom) contrast reveals general topography of strong projections and highlights axonal interdigitation originating from weak projections.

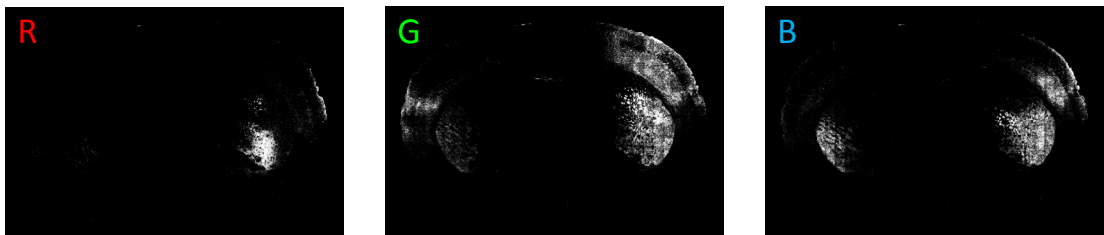
Figure S8 | Quantitative topography analysis workflow

Pre-processing

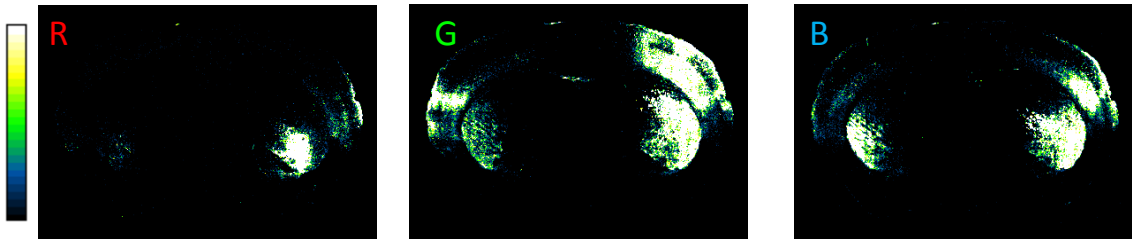
Spectral unmixing



Segmentation



Color-exclusive projection strength



Interdigitation maps

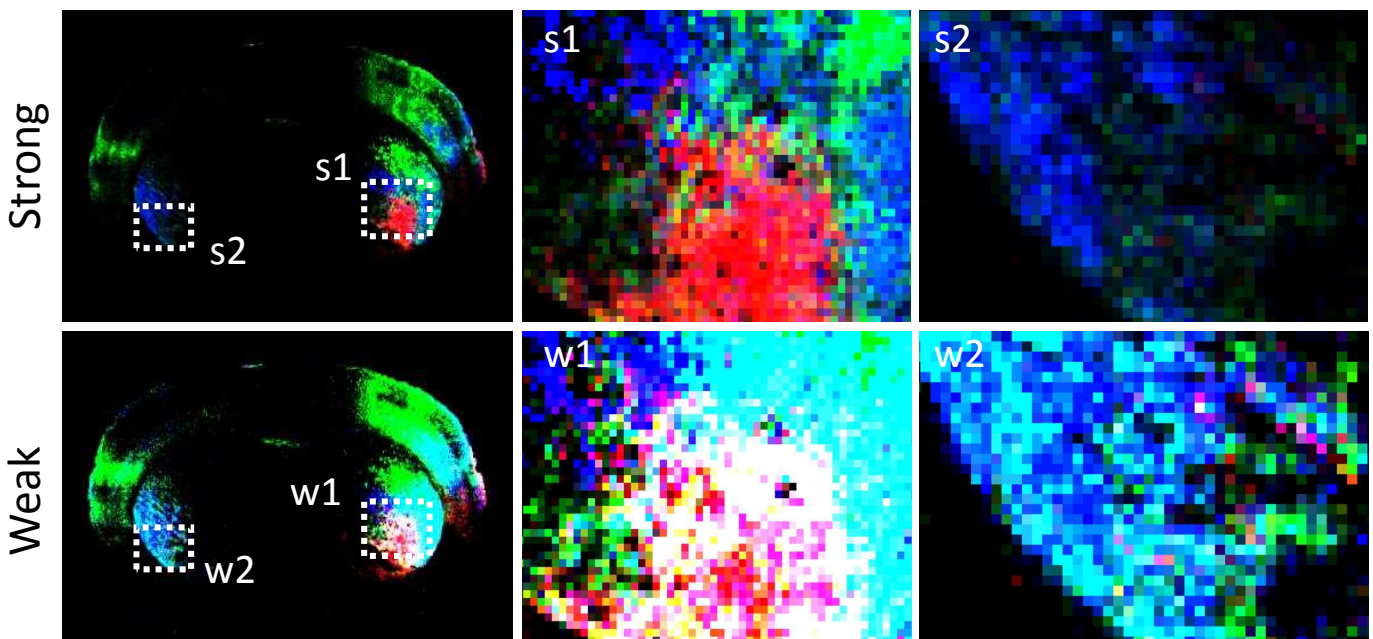
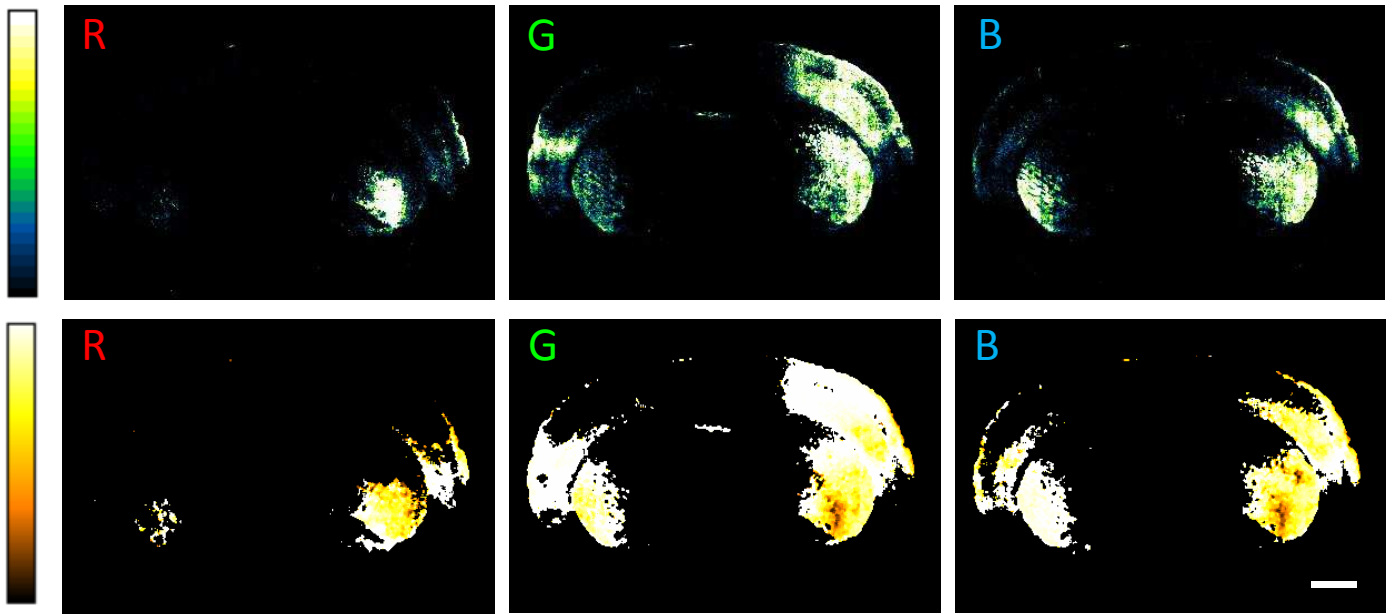
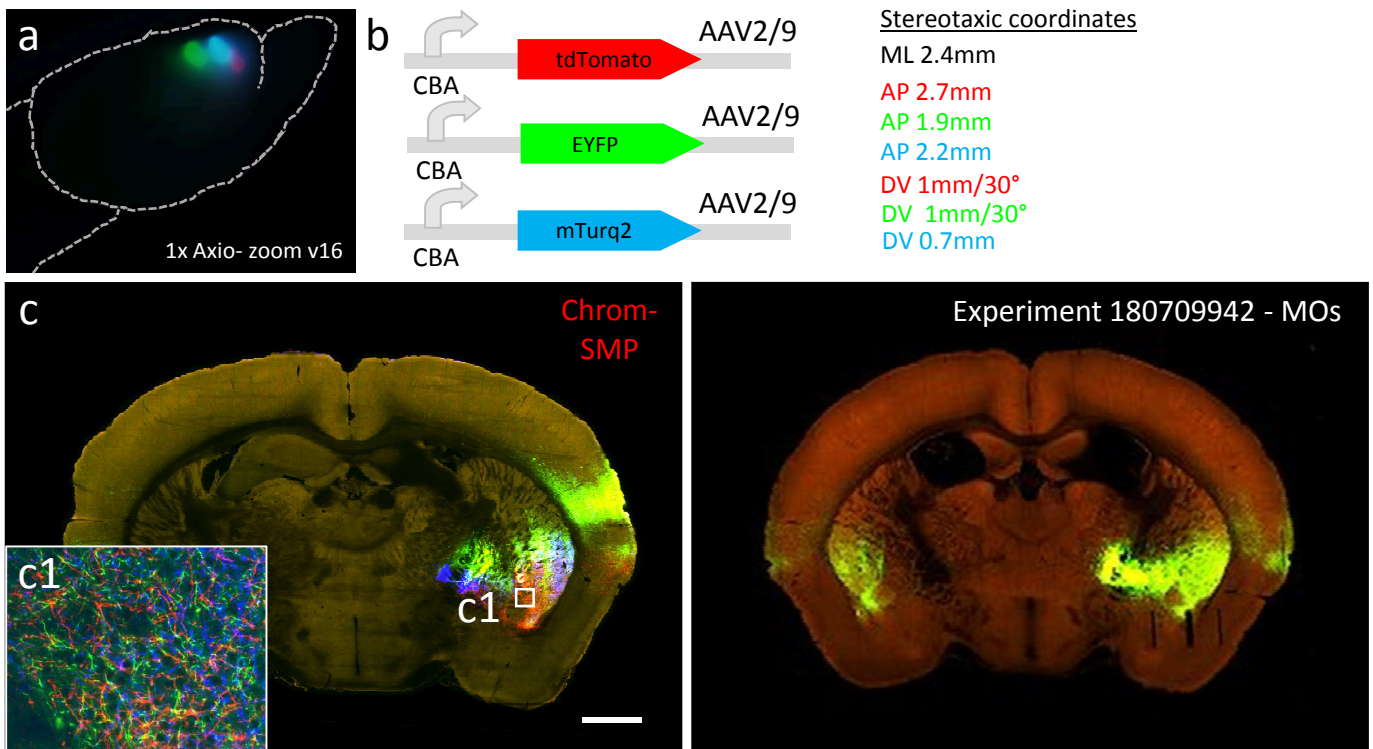


Figure S9 | Exclusive projection confidence maps



Top : Red, green, and blue exclusive projection strength maps. Signal intensity is represented in arbitrary units from weak (dark blue) to strong (white) projections. Bottom : Red, green and blue exclusive projection confidence maps. Exclusive projection confidence maps are computed as the ratio between projection strength maps calculated with exclusive HR masks over projection strength map calculated with raw HR masks. Exclusive projection confidence maps therefore account for eventual errors due to excluding dual-color pixels from interdigitation analysis. Signal intensity scales range from 0% (dark) to 80% (light). Pixel size : $24\mu\text{m} \times 24\mu\text{m}$. Scale bar : 1mm.

Figure S10 | Neural projection dissection with Chrom-SMP



(a) Epifluorescence whole-brain snapshot of tricolor injection areas. Image acquired on commercial Zeiss Axio-zoom microscope. (b) Viral constructs and injection coordinates used in tricolor multiplex AAV labeling (c) Multicolor 2D coronal section acquired with Chrom-SMP (left) and equivalent monocolor 2D coronal section (right) from the Allen Connectivity database (<http://connectivity.brain-map.org/>) shows the capability of Chrom-SMP to segregate neural projections for a given viral tracer injected volume and to visualize fine axonal interdigitation in target zone areas. Scale bar : 1mm.

Article 2 (en préparation)

LE RESEAU ASTROCYTAIRE CORTICAL EST CONSTRUIT A PARTIR D'UNITES CLONALES PLASTIQUES ISSUES DE PROGENITEURS PRE- ET POST-NATAUX

Solène Clavreul¹, Lamiae Abdeladim², Edwin Hernandez³, Jason Durand¹, Dragos Niculescu¹, Sio-Hoï Ieng¹, Raphaëlle Barry¹, Gilles Bonvento³, Emmanuel Beaurepaire², Jean Livet^{*1}, Karine Loulier^{*1}.

AFFILIATIONS

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM U968, CNRS UMR 7210, Institut de la Vision, Paris, France

²Laboratory for Optics and Biosciences, Ecole polytechnique, CNRS UMR 7645, INSERM U696, Palaiseau, France

³Molecular Imaging Research Center, CEA, CNRS UMR 9199, Fontenay-aux-Roses, France

* Correspondance. karine.loulier@inserm.fr, jean.livet@inserm.fr

RESUME

Les astrocytes représentent une des populations cellulaires les plus nombreuses du cerveau. Ces cellules gliales extrêmement ramifiées y jouent un rôle essentiel, notamment dans le cortex cérébral, où elles forment un réseau tridimensionnel continu tout en présentant une hétérogénéité importante au niveau morphologique, moléculaire et fonctionnel. Afin de déterminer comment le réseau astrocytaire est établi au cours du développement cortical murin, des analyses clonales ont été effectuées grâce à une stratégie de marquage multicolore permettant d'étudier simultanément la descendance de nombreux progéniteurs. Les résultats de ces travaux montrent que les clones d'astrocytes corticaux s'imbriquent avec leurs voisins et présentent une variabilité importante au niveau de leur composition en termes de nombre et sous-types cellulaires, leur organisation et leur dispersion spatiale. Le réseau astrocytaire se développe au cours d'une première phase dynamique de prolifération et de dispersion pendant la première semaine postnatale, suivie par une phase de maturation à l'échelle de la cellule avec augmentation du volume des astrocytes et de la complexité de leur arborisation. Ces travaux montrent par ailleurs la contribution non négligeable de progéniteurs post-nataux au réseau astrocytaire, qui s'ajoute à celle des cellules souches neurales corticales embryonnaires. La grande variabilité du réseau astrocytaire à l'échelle clonale suggère que son développement repose sur des unités clonales plastiques composées de cellules dont l'organisation spatiale et les caractéristiques finales dépendent probablement de leurs interactions avec leur environnement neuronal via des acteurs moléculaires qui restent à caractériser.

Title

Cortical astrocyte network is built from scattered seeding units undergoing plastic development at both clonal and individual cell level

Authors:

Solène Clavreul¹, Lamiae Abdeladim², Edwin Hernandez³, Dragos Niculescu¹, Jason Durand¹, Sio-Hoï Ieng¹, Raphaëlle Barry¹, Gilles Bonvento³, Emmanuel Beaurepaire², Jean Livet^{*1}, Karine Loulier^{*1,4}.

Affiliations:

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM U968, CNRS UMR 7210, Institut de la Vision, Paris, France

²Laboratory for Optics and Biosciences, Ecole polytechnique, CNRS UMR 7645, INSERM U696, Palaiseau, France

³Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Département de la Recherche Fondamentale, Institut François Jacob, Molecular Imaging Center (MIRCent), CNRS UMR 9199, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Fontenay-aux-Roses, France

⁴Current affiliation : Institut des Neurosciences de Montpellier, INSERM U1051, Montpellier, France

Abstract

Astrocytes play essential roles in neural tissue where they form an uninterrupted network, while displaying important local heterogeneity. To determine how this network is established during development, we performed multiclonal lineage tracing in the mouse cortex and analyzed large numbers of astrocyte clones derived from nearby progenitors. We show that cortical astrocyte clones intermix with their neighbors and display extensive variability in terms of spatial organization, numbers and subtypes of cells generated. We demonstrate that these clones develop through a dynamic phase of proliferation and spatial dispersion, and a maturation phase where morphological complexity and volume increase at the single cell level. Furthermore we show that the cortical astrocyte network is supplied continuously by ventricular progenitors that scatter in the neocortex both prior and after birth. Altogether these data support a model in which astrocytes continuously colonize the cortical parenchyma throughout embryonic and early postnatal development and where their clonal expansion and final morphotype are locally determined.

INTRODUCTION

Brain functions rely on the efficient cooperation of neurons and glial cells to shape and operate neural circuits. In the cerebral cortex, center of high cognitive functions in mammals, numerous studies have deciphered the neuronal contribution to cortical circuits and described how cortical neurons issued from dorsal (excitatory pyramidal neurons) and ventral (inhibitory interneurons) embryonic germinative zones, differentiate and migrate in a stereotyped manner to reach their final location where they respectively establish long and short range connections^{1,2}. At the same time, the development of the glial component of cortical circuits, in particular astrocytes, remains far less understood, despite their many crucial roles in brain circuit function and formation³⁻⁵. Beside their essential function at the blood brain barrier where they regulate nutrient uptake and blood flow, astrocytes also play critical roles in neuronal survival and synaptic function, recycling neurotransmitters and buffering potassium ions⁶. Other studies have also uncovered their active participation in synapse formation and pruning⁷.

Normal resting cortical astrocytes present two paradoxical characteristics: they tile the cortical grey matter in a continuous manner, forming an uninterrupted tridimensional network^{8,9}, as expected from cells belonging to a homogenous type; at the same time however, it is increasingly recognized that they form a heterogeneous population at the morphological, molecular and functional levels^{5,10-13}. Considerable divergence exists among astrocyte subtypes such as the fibroblast-like glia limitans of the pial surface^{14,15} and the protoplasmic astrocytes of the cortical parenchyma, which themselves display layer-related differences¹³. Former studies have established that cortical astrocytes originate from a fraction of delaminating embryonic progenitors of the dorsal telencephalon¹⁶⁻¹⁸, see for review¹⁹), while a possible added contribution of the postnatal germinative zones²⁰⁻²² is disputed²³. Following the colonization of the cortical parenchyma by astrocyte precursors, local proliferation considerably augments their numbers during early postnatal life²³. Clonal approaches have also revealed disparate patterns of dispersion of lineage-related astrocytes^{15-17,23,24} that demand further characterization. Indeed despite the above advances on cortical astrogenesis, a consensus has failed to emerge on several questions: whether cortical astrocyte subtypes are produced by predetermined progenitors as suggested by some studies^{15,25}, for review see¹⁰), or from non-specified progenitors generating similar astroglial descent which locally adapt to their substrate, as recently shown in the *Drosophila* ventral nerve cord²⁶; how stereotyped the composition and distribution of the descent of these progenitors is; and how they primarily invade the neocortex.

Here, using the MAGIC Markers combinatorial labeling strategy²⁷, we performed multiclonal lineage tracing in the mouse cerebral cortex and analyzed large numbers of astrocyte clones issued from nearby cortical progenitors labeled with color markers prior to the start of gliogenesis, and tracked over long periods of time. We show that cortical astrocyte clones display extensive variability concerning their structural organization, cell numbers and subtype composition, with a significant increase in clonal size in the upper part of the cortex. Furthermore, we demonstrate that the cortical astrocyte network develops through two stages that comprise a dynamic phase of proliferation accompanied by sister cell spacing, and a maturation phase where morphological complexity and volume increase at the single cell level while proliferation and spatial dispersion progressively abate. Moreover, we uncover a significant contribution of postnatal progenitors in addition to prenatal delaminated apical progenitors, both producing astrocytes that colonize the cortical parenchyma through scattered seeding units. These results indicate that cortical astrocyte network development relies on plastic rather than stereotyped clonal units, derived from pre- and postnatal progenitors that colonize the cortical wall in a largely disordered manner to differentially expand and mature, and whose descent probably acquire their final characteristics through interactions among themselves or with their environment.

RESULTS

Multiplexed identification and tridimensional imaging of astrocytes clones in the intact mouse cerebral cortex.

To determine how the astroglial network is established during corticogenesis, we tracked astrocyte development with the MAGIC Markers (MM) strategy²⁷, enabling us to label large numbers of clones of neural cells generated by individual embryonic progenitors with combinations of fluorescent protein (FP) markers. In this approach, astrocyte clones are identified by two Cre-dependent genome-integrating transgenes (^{PB}*Cytbow* and ^{T2}*Nucbow*) that stochastically express FPs addressed to distinct subcellular compartments (cytoplasm and nucleus, Fig. 1a-b). Expression from the ubiquitous *CAG* promoter avoids biases associated with unequally regulated astrocyte markers such as GFAP^{28,29}. We delivered MM to cortical progenitors through *in utero* electroporation (IUE) at embryonic day (E)15, prior to gliogenesis, to permanently mark these cells and their descent and study the spatial organization of astrocyte clones and its evolution during postnatal brain development (Fig. 1c-e, Supplementary Fig.1a-b). Inventory of color combinations found in the 12 animals analyzed and calculation of their frequency enabled us to identify rare labels (<2% of labeled astrocytes) that were used to identify astrocyte clones (Supplementary Fig.1c-h). Based on these criteria, 36-160 clones could be identified per brain.

To analyze in an unbiased manner the spatial distribution and structure of astrocyte clones during the three first postnatal weeks, we performed large tridimensional high-resolution multicolor reconstruction of brains labeled with MM using a new chromatic serial multiphoton microscopy approach (Chrom-SMP; Abdeladim et al, submitted; Fig. 1f-h). This enabled us to image large ($\geq 8 \text{ mm}^3$) volumes of cortical parenchyma at P7 and P21 stages with near-micrometric resolution, thus giving us access the spatial position and tridimensional arrangement of each labeled clones, with all its astroglial cells accounted for (Fig. 1j-k).

Cortical astrocyte clones display varied spatial distribution and structural organization that do not evolve between P7 and P21.

Tridimensional mapping with Chrom-SMP revealed a high variability of protoplasmic astrocyte (PrA) clones in terms of both their 3D spatial dispersion and volume at P7 and P21. We observed that on average, PrA clones dispersed over several dozens of microns in all three axes, with a significant wider spread along the dorsoventral axis (Fig. 2a-b), and presented no preferential location in specific cortical layers. While probing the spatial organization of PrA clones using cell coordinates and Delaunay triangulation, we found that PrA clones could be composed of clusters of cells in contact with each other, but also of multiple disconnected elements (Fig. 2c), at times scattered over extended volumes (up to $1,86 \times 10^6 \mu\text{m}^3$, i.e. more than 30 times the volume of individual astrocyte domains, Fig. 2d-e, Supplementary Fig. 2b-c), indicating significant intermixing with their neighbors. The spatial arrangement and volume of the clones were highly variable, at P7 as well as P21 (Fig. 2d-e, Supplementary Fig. 2b-d, also see Supplementary Resource showing each individual clone layout). Yet at both stages, we found that PrA clones were composed of a similar number of disconnected elements (2.8 ± 0.3 at P7 vs. 2.9 ± 0.3 , at P21, Fig. 2f-g), and the proportion of clustered clonal PrAs remained stable ($78.7\% \pm 4.5$ at P7 and $73.8\% \pm 4.0$ at P21 Fig. 2h), with 1.9 clusters per clone at P7 and 1.7 at P21 on average (data not shown) containing 3.5 cells at P7 and 3.7 at P21 on average (data not shown). The absence of variation of these two parameters between P7 and P21 suggests that no major cellular rearrangements takes place among PrA clones during this time period.

Thus the local proliferation of intermediate astrocyte progenitors recognized as the main source of cortical astrocyte production during the first postnatal week²³, is not fully cohesive and leads to a significant intermixing of neighboring clones, but the spatial arrangement of the clones after this period seems largely stable.

Whereas astrocyte clone organization remains stable, individual astrocyte morphological complexity and territorial volume both increase during cortical maturation.

When we analyzed the morphology of individual PrA among the labeled clones imaged by Chrom-SMP through semi-automated segmentation (Fig. 3a, Supplementary Fig. 3a-b), we observed that at an individual level the volume of neural tissue (termed domain or territorial volume^{8,13,30}) that they covered increased by 65.7% between P7 and P21 (Fig. 3b), corroborating recent work based on sparse astrocyte labeling using postnatal electroporation³¹. In addition, we found that this age-dependent expansion of PrA was manifest in all cortical layers (Fig. 3c and Supplementary Fig. 3c). To understand how such expansion of the outer frontier of astrocyte domains was accompanied by changes in their arborization pattern, we reconstructed the processes of individual MM-labeled astrocytes from diffraction-limited confocal microscopy images. This revealed a strong increase of astrocyte processes complexity, with a near doubling of the number and length of arbor branches between P7 and P21 (Fig. 3d-g and Supplementary Fig. 3d-g), accompanied with a 7.3% and 5.7% increase in the density of branches and endings per μm^3 , respectively, between P7 and P21 (data not shown). These data explain why the astrocyte coverage of the neuropil appears denser at P21 than at P7 (Fig. 3h). Thus between P7 and P21 when the relative arrangement of astrocytes does not evolve anymore, astrocyte arborization not only grows to occupy an expanded territory, but complexifies such that its density increases significantly.

Embryonic cortical progenitors generate variable numbers and subtypes of astrocytes.

To further characterize the potentialities of astrogenic cortical progenitors, we electroporated MM at E15 and analyzed astroglial clones displaying rare color markers at P4, P7 and P21, which we mapped on serial brain sections (Fig. 4a). These clones were composed on average of 4 and 8 cells at P4 and P7-P21 respectively (Fig. 4b), reflecting a twofold increase in astrocyte population during the first postnatal week, and the cessation of their proliferation afterwards, confirming previous reports^{17,22,23}. However more surprisingly, we found that these clones could sometimes spread throughout the entire thickness of the neocortical wall and were highly variable in size, with clones comprised of 1 to 34 cells at P7, suggesting unstereotyped expansion of these cells during development (Fig. 4c).

Next we investigated the subtype composition of astrocyte clones (Supplementary Fig. 4a-b). Three types of clones could be unambiguously identified based on the distinct morphologies of the cells that they comprised: i) homogeneous PrA clones (Fig. 4d), ii) homogeneous pial astrocyte (PiA) clones (Fig. 4e), and iii) heterogeneous clones containing both PrA and PiA (Fig. 4f). The vast majority of labeled clones were composed of only PrA (76%), whereas exclusively PiA clones represented a minority (5%) and surprisingly 19% contain both PrA and PiA (Fig. 4g), with more than 80% of PiA-containing clones also encompassing at least one PrA. This differed from previous work that supported the existence of distinct lineages for

these two astrocyte subtypes playing distinct roles in the adult brain^{15,20}. Even as the astrocyte population doubled between P4 and P7-P21, the proportion of each type of clones remained stable (Fig. 4g). While heterogeneous clones were larger than homogeneous PrA (Fig. 4h), we observed that the size of both homogeneous and heterogeneous clones significantly increased along the radial axis, (i.e. clones found in the upper part of the cortex were larger than those located in lower layers) (Fig.4i, Supplementary Fig. 4c-d), suggesting that their position and not their subtype composition was the main factor influencing their capacity to expand. We conclude from these results that clonally related cortical astrocytes are not fate-restricted but have the ability to adopt different morphotypes according to their location in the cerebral cortex. In support of this, we found several cases of cells displaying an intermediate morphology that combined the fibroblast-like extension of PiA and the bushy ramifications of PrA (Fig. 4j).

Expansion of cortical astrocyte clones relies on proliferation and spacing between sister cells that lessen over as development proceeds.

To understand how such heterogeneous astrocyte clones develop, we explored the expansion dynamics of sister cells. Following the observation that PrA clones displayed variable spatial arrangements (columns, clusters, mix of both, Fig. 5a, Fig. 1-2, Supplementary Fig. 2), we analyzed the spatial dispersion of multicolor PrA clones along the dorso-ventral (DV) and medio-lateral (ML) axes at P4 and P7, during and at the end of their proliferative period (Fig. 5b). The inventory of sister cells location over the cortical parenchyma revealed a considerable heterogeneity in the spatial distribution of sister cells along both DV and ML axis (Fig. 5e-f), which could for instance form tight clusters or disperse over most of the cortical wall. However, we observed that the relative dispersion of the clones (spread of clones over their total number of sister cells) did not increase between P4 and P7, indicating that astrocyte local proliferation during that period was not accompanied by a wide scattering of clonally related cells, which instead densified over time (Fig. 5c-d).

We then focused on sister cell proliferation to understand better how astrocyte clones evolve. We injected EdU either 48hr or 24hr prior analysis at P4 and P7 (Fig. 5g-i) to determine whether recently divided sister astrocytes stay together as doublets of closely apposed cells, a feature long considered as proliferative figures of astrocytes²³ or move away from each other over time. We found that sister cells labeled with EdU 48hr prior sacrifice were located further apart than those marked 24hr in advance, and this at both P4 and P7 (Fig. 5i), showing that their cell bodies moved apart from each other over time. Markedly smaller spacing (inferior to the average diameter of astrocyte domains) was observed at P7, indicating that network expansion slowed down as development proceeded (Fig. 5i).

Interestingly, we observed that 20% of labeled cells belonged to doublets (Fig. 5j-k), irrespective of the developmental stage (Fig. 5j-k and Supplementary Fig. 5a-d). This, added to the drastic drop in the proliferation rate during the first postnatal week (almost null at P21, data not shown, see²³), led us to conclude that astrocyte doublets are not a reliable indicator of recent divisions but can result from the progressive stalling of astrocyte network expansion. Next we assessed the identity, PrA or PiA, of proliferating cells. We show that both PrA and PiA Ki67+ cycling astrocyte populations are reduced by half between P4 and P7 (Supplementary Fig. 5f) corroborating the proliferation decline occurring during the first postnatal week²³ that affected both PrA and PiA equally. Interestingly 23% of labeled PiA are EdU+ at P4 and only 9% at P7 whereas around 11% of labeled PrA are EdU+ at both P4 and P7 suggesting a differential mitotic behavior between PrA and PiA astrocytes between these two developmental stages (Fig. 5l).

Altogether, these data suggest that astrocyte clone expansion, after an early phase of non-cohesive proliferation that generates the dispersed patterns observed at P4, evolves towards more and more cohesive proliferation, leading to densification of the clones between P4 and P7. Newly generated sister cells move away from their siblings at a distance that diminishes over time and the final network architecture reflects the progressive stalling of this process, with numerous astrocytes remaining as doublets (Fig. 5m).

Both embryonic delaminated apical and postnatal progenitors supply the cortical astrocyte network through scattered seeding units.

Having characterized the organization and expansion dynamics of cortical astrocyte clones, we next sought to determine how and when their parent precursors are seeded in the neocortex during development. While embryonic colonization followed by local proliferation was recently proposed as the sole source of astrogenesis²³, former studies have suggested additional contribution from postnatal progenitors^{21,22}. The absence of an early astroglial marker that would distinguish young cortical astrocytes from radial glia cells prevents tracking of the embryonic delaminated pool of early born cortical astrocytes. However, such astrocyte precursors were included in cells labeled by embryonic electroporation of MAGIC Markers, which provided an opportunity to explore candidate markers of early astrocyte lineage. While S100 β , a marker of differentiated astrocytes, did not co-localize with MM pre- or perinatally, immunolabeling revealed that Olig2 transcription factor was present in 5.1% (\pm 1.0%) at E18 and 9.5% (\pm 1.1%) at P0 of MM+ cell population (Fig. 6a-b). Olig2 status as a general macroglial lineage marker expressed by astrocyte precursors in the brain gray matter remains debated³²⁻³⁵. To clarify its link with the astroglial lineage, we electroporated MM constructs in *Olig2*^{Cre} embryos and characterized the identity of labeled cells at postnatal stages, when astrocyte identity can be reliably assessed based on morphology and marker

expression. At P7 and P21, in addition to oligodendrocytes, Olig2-traced cells also comprised astrocytes of both protoplasmic and pial subtype, identified by morphological features (Fig. 6c and Supplementary Fig. 6a-b) and the presence of the astrocyte-specific markers S100 β and Aldh1l1 (Fig. 6d). Expression of Olig2 and these two markers could even be observed in sister cells of a single clone (Fig. 6d). Further confirmation of Olig2 as a marker of astrocyte lineage in the cortical gray matter was obtained by crossing *Olig2^{Cre}* mice with a transgenic *CAG-Cytbow* line, which yielded near-continuous PrA labeling in the cortical parenchyma of adult animals (Supplementary Fig. 6c). Thus a pool of Olig2+ precursors of the embryonic cortex accessible to electroporation gives rise to the vast majority, if not all, of cortical astrocytes. To understand how Olig2 lineage-derived cells (and their astrogenic population) invade the cortex, we performed MM electroporation in E13 *Olig2^{Cre}* embryos and analyzed at E18 the spatial distribution of color-expressing cells (Fig. 6e). These cells were found scattered along the DV axis of the neocortex with no apparent preferential location or orchestrated segregation. Moreover, electroporation of a genome-integrative transposon vector (*^{Tol2}CAG-EYFP*) in E15 wild type embryos enabled us to track YFP+/Olig2+/Aldh1l1+ cells that were also found scattered in the E18 neocortex (Fig. 6f). Together with the clonal results presented before, these data support the idea that astrocyte precursors disperse prenatally in the cortical parenchyma where they expand as scattered clonal units.

Next we determined whether cortical astrocytes were solely derived from precursors that colonized the neocortex prenatally or whether they could also be derived from postnatal progenitors. We performed postnatal co-electroporation of episomal (*CAG-RFP*) and integrative vectors (*^{Tol2}CAG-EYFP* transposon), respectively expressing fluorescent reporters transiently in electroporated progenitors or in their entire descent. We found few astrocytes labeled with the episomal marker, located mainly in the cortical white matter and pial surface (Fig. 6g), as previously reported by Ge and colleagues²³. Surprisingly however, we also found numerous astrocytes labeled with *^{Tol2}CAG-EYFP* in the cortical gray matter, showing that a significant population of cortical astrocytes derive from postnatal progenitors (Fig. 6g). Similarly, electroporation of a Cre-expressing plasmid in transgenic *CAG-Cytbow* mice at P0 labeled numerous color-expressing cortical astrocytes, identified based on morphology as well as S100 β and Aldh1l1 expression, which included both protoplasmic and pial subtypes (Fig. 6h; data not shown). These astrocytes were found as early as three days post-electroporation scattered in both upper and lower cortical layers, with no apparent preferential location (Fig. 6i). Thus a significant proportion of cortical astrocytes originate from postnatally delaminating cells and like those that emigrate at embryonic stages from the ventricular niche, they disseminate into the cortical parenchyma and give rise to scattered clones (Fig. 6g-h).

To further characterize the progenitors that produce cortical astrocytes, we crossed *R26CAG-SLS-tdTomato (Ai9)*³⁶ reporter mice with a *Nestin-CreER*³⁷ driver expressing an inducible recombinase under the control of *Nestin*, expressed in neural progenitors of the embryonic and postnatal germinative zones and downregulated in mature astrocytes. We then electroporated integrative *Tol2CAG-EYFP* constructs in E15 cortical progenitors of *NestinCreER;Ai9* embryos and triggered recombination at P0 with a high dose of Tamoxifen. In this approach, astrocytes derived from embryonic apical progenitors are YFP+ (green) whereas astrocytes born from precursors expressing Nestin at P0 (whichever their location) are Tomato+ (red) (Supplementary Fig. 6d). 7 days after Tamoxifen induction, large numbers of cortical astrocytes, localized throughout the entire parenchyma, were labeled in red (Supplementary Fig. 6e), indicating that they were derived from Nestin+ precursors at or after P0. A fraction of the tdTomato+ astrocytes also expressed YFP, showing that embryonic progenitors contributed to the pool of postnatally active Nestin+ precursors. Finally, the presence of YFP+/tdTomato- astrocytes suggested that at least a fraction of early-generated astrocytes had left the apical germinal zone prior birth and downregulated Nestin. Analysis of the location in the cortical parenchyma of both YFP+ and YFP+/Tomato+ cells showed a slightly shifted location of postnatally-generated PrA astrocytes in the upper part of the neocortical wall compared to those with direct embryonic origin (Supplementary Fig. 6f). However both embryonic and postnatal progenitors produced the same proportions of PrA and PiA: around 40% and 10% of labeled astrocyte descent, respectively (Supplementary Fig. 6g).

Altogether these data indicate that both embryonically and postnatally-delaminated cortical progenitors contribute to the astroglial network, with a large fraction of astrocytes being generated after birth from Nestin+ precursors.

In conclusion, our work provides a comprehensive view of cortical astrocyte network formation, maturation and final clonal architecture. It demonstrates significant plasticity of immature cortical astrocytes that may further acquire subtype characteristics through interactions with their environment.

DISCUSSION

Altogether our data provide a comprehensive view of astrocyte network formation and maturation during mouse cortical development. This complex process, spread out during prenatal and postnatal development, can be separated in three successive steps, whose temporal frontiers overlap (Fig. 7): 1) colonization of the neocortical wall by a fraction of embryonic apical progenitors which delaminate from the VZ; 2) expansion during the first postnatal week involving the local proliferation of astrocytes derived from scattered delaminated embryonic progenitors, but also continued, non-ordered colonization of the

cortical parenchyma by new precursors which remain capable of generating both protoplasmic and pial astrocytes; 3) a maturation phase where individual astrocytes increase both the volume of their territory and the complexity of their processes, while addition of new astrocytes to the already existing network have ceased.

Clonal architecture of the astroglial network

By combining multiplexed clonal labeling and high-resolution 3D large volume multichannel imaging with the MAGIC Markers and Chrom-SMP schemes, we provide for the first time a detailed view of the clonal architecture of the astroglial network. We show that the apparent continuity of this network conceals its disparate clonal composition. Contrary to pyramidal neuron clones, which form relatively stereotyped columnar units typically spanning the entire thickness of the cortex¹⁶, the astrocyte network is built of a patchwork of clones that are highly diverse in terms of cell numbers, subtypes composition and shape (Fig. 2 and Supplementary Fig. 2). This variability of cortical astrocyte clones parallels that recently reported for in the *Drosophila* ventral neural cord²⁶. The composition and layout of the clones, comprising in average 8 cells distributed in 2-3 separate clusters, suggests the following developmental model, further supported by time-course and birthdating data (Fig. 5): during the earliest stages of clonal expansion, sister astrocytes significantly disperse and intermix with neighboring clones, either through non-cohesive divisions or the intercalation of newly delaminated precursors. As development proceeds, clonal dispersion progressively diminishes, resulting in the formation of cohesive clusters of sister cells within clones (Fig. 5i). Ultimately, as space becomes restricted, newly divided cells cannot separate much from each other and remain as stable doublets with juxtaposed cell bodies (Fig. 5j). As result of this developmental process, the astroglial network presents a high degree of clonal mixing at virtually any cortical location, a feature that could mitigate the detrimental consequences of somatic mutations affecting clones.

Astrocyte local proliferation

Interestingly, we were not able to link any feature of astrocyte clones with their final location in the cortical parenchyma, except for their size, clones in upper cortical layers being significantly larger compared to those in lower layers. These clones may be larger for several possible reasons: first, their parent progenitor may have colonized this part of the neocortex early on and have had more time to divide. However, upper layers continue to be supplied by new astrocytes at P0, arguing against this idea. Unequal precursor seeding in upper layers (Fig. 6i) may also necessitate larger clonal expansion to establish continuous tiling in these areas. The augmented clonal size could also be related to the presence of mitotic cues in the upper part of the cortex that could for instance be produced by the extended surface vasculature.

In the rest of the cortex, which factors may determine and regulate the size of astrocyte clones? Recently, astrocyte intermediate progenitor proliferation has been shown to increase in a cell autonomous manner in absence of Lgl1 using MADM genetic fate mapping²⁴. While intrinsic determinants such as Lgl1 may limit astrocyte proliferation, the variability of clonal size and patterns that we observed indicates that additional factors likely modulate astrocyte clone expansion. Competition for access to neurons and blood vessels may condition their ability to proliferate. Astrocytes themselves are also likely candidates to regulate their own proliferation through competition for space and homeostatic interactions with their neighbors^{26,38}, which may suffice to regulate their proliferation and ensure complete tiling of the neuropil. Astrocyte doublets may represent a consequence of such interplay. Molecular cues produced by astrocytes, neurons and endothelial cells could also participate in this process. The nature of these instructive signals remains to be established, as well as their source of production. A worthy candidate could be the vascular derived trophic factor Heparin Binding Epidermal Growth Factor (HBEGF), found to modulate astrocyte survival in vitro³⁹. Many other diffusible or membrane-bound candidates could be considered, such as proliferative growth factors that could be secreted by the basal lamina or endothelial cells, or trophic factors and transmembrane proteins produced by neighboring neurons.

Genesis of astrocyte subtypes

The diversity of cortical astrocyte clones that we observed argues against the existence of heterogeneous progenitors with distinct and deterministic behaviors. A second observation hinders the hypothesis of such deterministic progenitors: a significant proportion of heterogeneous clones (19%) comprise both protoplasmic (PrA) and pial astrocytes (PiA), and most PiA-containing clones (>80%) also contain PrA (Fig. 4g), arguing in favor of a common progenitor for these two subtypes. This finding is corroborated by the striking observation of cells displaying an intermediate morphology between PrA and PiA (Fig. 4j). This suggests that these two categories of astrocytes may not represent defined subtypes specified by an intrinsic program, but correspond instead to plastic morphotypes resulting from the adaptation of a single type to its local environment. Indeed each morphotype retains the ability to form close interactions with astrocytes of the other category, ensuring continuous tiling of cortical tissue.

This conclusion is at odd with previous clonal studies based on the StarTrack clonal labeling strategy¹⁵, which reported only a minority (20%) of PiA-containing clones that comprised PrA. This led the authors to conclude that these two astrocyte subtypes derive from largely separate lineage branches. Our discordant conclusions are likely explained by the use of a GFAP promoter to drive StarTrack clonal markers^{15,40}, known to be unequally regulated among astrocytes, with in particular high PiA vs. low PrA expression^{28,29}. Clonal labeling

based on this promoter therefore likely leads to underestimate the proportion of bipotent precursors.

Astrocyte maturation

Thanks to the multicolor labeling that grants access to fine cellular morphology in dense labeling conditions, we could assess the morphological changes that astrocytes undertake during corticogenesis. As Stogsdill and collaborators³¹, we observed an increase in the territory and morphological complexity of individual astrocytes between P7 and P21. Our observations also indicate that this expansion can at least be partially accounted by the filling of concave gaps between astrocyte main branches (Fig. 3d, h). In addition, local adaptation of astrocytes to their substrate likely plays an important role in shaping their territory. Indeed in a recent study, Lanjakornsiripan et al. have found layer differences in astrocyte territory that are altered in *reeler* mutant mice presenting inverted cortical layers¹³. To which extend such layer differences and developmental changes in astrocyte territory may be explained by modifications in the underlying neuropil remains to be examined,

Beyond observations at postnatal stages, the availability of the Olig2 marker also enabled us to visualize in the embryonic mouse neocortex the morphology of early invading glial cells comprising young astrocytes. Interestingly, as at P4 stage, these cells exhibited mainly a bipolar morphology, but contrary to neurons of the same developmental stage, they presented more ramified extremities that were not strictly radially oriented (Fig. 6a,e). Thus, the morphology of young cortical astrocytes becomes gradually more complex, apparently independent of the timing of their arrival in the cortex, but rather correlated to their environment. Indeed at any given age, all astrocytes appear to present the same degree of morphological complexity that progressively increases from embryonic to adult stages.

Origin of astrocytes and colonization of the neocortex

Tracking the earliest steps of astrocyte development has been difficult due to a lack of marker. We show here that the transcription factor Olig2, often associated with oligodendrocyte lineage in neurodevelopmental studies, also enables to trace the entire cortical gray matter astroglial lineage, extending previous findings³²⁻³⁵. Although not specific of astrocytes, this marker enables to follow the population of young glial cells that includes astrocyte precursors as they colonize the neocortex. With this tool, we did not observe an organized pattern of migration like that of pyramidal neurons which radially migrate in cohorts related to their birth date^{1,2}. Non-ordered colonization of the cortex by astrocytes was confirmed by labeling postnatal progenitors, which showed the same non-restricted potentialities to invade all cortical layers and contrary to what has been previously published²⁰, to generate distinct astrocyte subtypes as those targeted during embryogenesis. We thus reconcile previous observations about the source of cortical astrocytes, delaminated

embryonic^{17,23} versus postnatal progenitors^{20,22,41}, by showing that both contribute to astroglial development. The postnatal progenitors are accessible to postnatal electroporation and could thus comprise either RGs that remain present during the perinatal period, but also SEZ progenitors. Both delaminated embryonic and postnatal-derived astrocyte precursors colonize the neocortex seemingly at random, forming scattered seeding units at the basis of the clonal architecture described above.

Conclusion

Altogether, our work, argue in favor of a plastic behavior of immature cortical astrocytes during development that originate from non-specified progenitors and may further acquire subtype characteristics through interactions with their environment at later developmental stages.

Supplementary Information is available in the online version of the paper.

Acknowledgements. We thank J. Corbin for scientific discussions and comments on the manuscript. We thank the SEAT team for pronuclear injection, A. Chédotal for providing transgenic mouse lines, M. Daclin for training with postnatal electroporation, and S. Fouquet and IdV core imaging, animal experimentation and histology facility for technical assistance. This work was supported by fellowships from Région Ile-de-France and Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer to S.C, and from Université Paris-Saclay (Initiatives Doctorales Interdisciplinaires) to L.A., by Agence Nationale de la Recherche under contracts ANR-10-LABX-65 (LabEx LifeSenses), ANR-11-EQPX-0029 (Equipex Morphoscope2), by Fondation pour la Recherche Médicale (Ref. DBI20141231328) and by the European Research Council (ERC-CoG 649117).

Author Contributions. K.L., J.L. and S.C. designed the experiments and wrote the paper with the contribution of G.B and E.H. for morphological analysis. All authors reviewed and edited the manuscript. S.C. performed the experiments, acquired all confocal images, analyzed data and made the figures. L.A. and E.B. designed and built the Chrom-SMP set-up and L.A. acquired and processed the images. E.H. performed high resolution astrocyte reconstruction. R.B assembled the transgene constructs. S.C., D.N. and SH.I. automated the analysis. J.D. genotyped animals and provided assistance for image processing and quantifications.

Competing interests. The authors declare no competing financial interests.

References

1. Taverna, E., Götz, M. & Huttner, W. B. The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 465–502 (2014).
2. Greig, L. C., Woodworth, M. B., Galazo, M. J., Padmanabhan, H. & Macklis, J. D. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 755–769 (2013).

3. Molofsky, A. V. *et al.* Astrocyte-encoded positional cues maintain sensorimotor circuit integrity. *Nature* **509**, 189–194 (2014).
4. Martín, R., Bajo-Grañeras, R., Moratalla, R., Perea, G. & Araque, A. Circuit-specific signaling in astrocyte-neuron networks in basal ganglia pathways. *Science* **349**, 730–734 (2015).
5. Chai, H. *et al.* Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence. *Neuron* **95**, 531–549 (2017).
6. Barres, B. A. The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. *Neuron* **60**, 430–440 (2008).
7. Farhy-Tselnicker, I. & Allen, N. J. Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. *Neural Develop.* **13**, 7 (2018).
8. Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z. & Ellisman, M. H. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **22**, 183–192 (2002).
9. Ogata, K. & Kosaka, T. Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience* **113**, 221–233 (2002).
10. Bayraktar, O. A., Fuentealba, L. C., Alvarez-Buylla, A. & Rowitch, D. H. Astrocyte Development and Heterogeneity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, (2015).
11. Schitine, C., Nogaroli, L., Costa, M. R. & Hedin-Pereira, C. Astrocyte heterogeneity in the brain: from development to disease. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 76 (2015).
12. Zhang, Y. *et al.* Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron* **89**, 37–53 (2016).
13. Lanjakornsiripan, D. *et al.* Layer-specific morphological and molecular differences in neocortical astrocytes and their dependence on neuronal layers. *Nat. Commun.* **9**, 1623 (2018).
14. Liu, X. *et al.* The superficial glia limitans of mouse and monkey brain and spinal cord. *Anat. Rec. Hoboken NJ 2007* **296**, 995–1007 (2013).
15. García-Marqués, J. & López-Mascaraque, L. Clonal Identity Determines Astrocyte Cortical Heterogeneity. *Cereb. Cortex* **23**, 1463–1472 (2013).
16. Gao, P. *et al.* Deterministic Progenitor Behavior and Unitary Production of Neurons in the Neocortex. *Cell* **159**, 775–788 (2014).
17. Magavi, S., Friedmann, D., Banks, G., Stolfi, A. & Lois, C. Coincident Generation of Pyramidal Neurons and Protoplasmic Astrocytes in Neocortical Columns. *J. Neurosci.* **32**, 4762–4772 (2012).
18. Voigt, T. Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: Direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J. Comp. Neurol.* **289**, 74–88 (1989).
19. Tabata, H. Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. *Front. Neurosci.* **9**, (2015).
20. Gressens, P., Richelme, C., Kadhim, H. J., Gadisseux, J. F. & Evrard, P. The germinative zone produces the most cortical astrocytes after neuronal migration in the developing mammalian brain. *Biol. Neonate* **61**, 4–24 (1992).
21. Levison, S. W., Chuang, C., Abramson, B. J. & Goldman, J. E. The migrational patterns and developmental fates of glial precursors in the rat subventricular zone are temporally regulated. *Development* **12** (1993).
22. Burns, K. A., Murphy, B., Danzer, S. C. & Kuan, C.-Y. Developmental and post-injury cortical gliogenesis: a genetic fate-mapping study with Nestin-CreER mice. *Glia* **57**, 1115–1129 (2009).

23. Ge, W.-P., Miyawaki, A., Gage, F. H., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex. *Nature* **484**, 376–380 (2012).
24. Beattie, R. *et al.* Mosaic Analysis with Double Markers Reveals Distinct Sequential Functions of Lgl1 in Neural Stem Cells. *Neuron* **94**, 517–533 (2017).
25. Tsai, H.-H. *et al.* Regional Astrocyte Allocation Regulates CNS Synaptogenesis and Repair. *Science* **337**, 358–362 (2012).
26. Enriquez, J. *et al.* Differing Strategies Despite Shared Lineages of Motor Neurons and Glia to Achieve Robust Development of an Adult Neuropil in *Drosophila*. *Neuron* **97**, 538–554 (2018).
27. Loulier, K. *et al.* Multiplex Cell and Lineage Tracking with Combinatorial Labels. *Neuron* **81**, 505–520 (2014).
28. Lee, Y., Su, M., Messing, A. & Brenner, M. Astrocyte heterogeneity revealed by expression of a GFAP-LacZ transgene. *Glia* **53**, 677–687 (2006).
29. Yoon, H., Walters, G., Paulsen, A. R. & Scarisbrick, I. A. Astrocyte heterogeneity across the brain and spinal cord occurs developmentally, in adulthood and in response to demyelination. *PLoS One* **12**, (2017).
30. Bushong, E. A., Martone, M. E. & Ellisman, M. H. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int. J. Dev. Neurosci.* **22**, 73–86 (2004).
31. Stogsdill, J. A. *et al.* Astrocytic neurologins control astrocyte morphogenesis and synaptogenesis. *Nature* **551**, 192–197 (2017).
32. Marshall, C. A. G., Novitsch, B. G. & Goldman, J. E. Olig2 Directs Astrocyte and Oligodendrocyte Formation in Postnatal Subventricular Zone Cells. *J. Neurosci.* **25**, 7289–7298 (2005).
33. Cai, J. *et al.* A crucial role for Olig2 in white matter astrocyte development. *Development* **134**, 1887–1899 (2007).
34. Ono, K. *et al.* Regional- and temporal-dependent changes in the differentiation of Olig2 progenitors in the forebrain, and the impact on astrocyte development in the dorsal pallium. *Dev. Biol.* **320**, 456–468 (2008).
35. Tatsumi, K. *et al.* Olig2-Lineage Astrocytes: A Distinct Subtype of Astrocytes That Differs from GFAP Astrocytes. *Front. Neuroanat.* **12**, (2018).
36. Madisen, L. *et al.* A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat. Neurosci.* **13**, 133–140 (2010).
37. Lagace, D. C. *et al.* Dynamic Contribution of Nestin-Expressing Stem Cells to Adult Neurogenesis. *J. Neurosci.* **27**, 12623–12629 (2007).
38. Molofsky, A. V. & Deneen, B. Astrocyte development: A Guide for the Perplexed: Mechanisms of Astrocyte development. *Glia* **63**, 1320–1329 (2015).
39. Foo, L. C. *et al.* Development of a Method for the Purification and Culture of Rodent Astrocytes. *Neuron* **71**, 799–811 (2011).
40. Cerrato, V. *et al.* Multiple origins and modularity in the spatiotemporal emergence of cerebellar astrocyte heterogeneity. *PLoS Biol.* **16**, (2018).
41. Levison, S. W. & Goldman, J. E. Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron* **10**, 201–212 (1993).

Online Methods

Transgenes. MAGIC Markers (^{PB}CAG-Cytbow and ^{Tol2}CAG-Nucbow) and vectors expressing self-excisable Cre recombinase, PiggyBac and Tol2 transposases from a CAG promoter⁴² were previously described in ref. ²⁷. The *Tol2-CAG-mEYFP* integrative vector was produced by cloning *mEYFP*⁴³ under a CAG promoter in a custom-designed plasmid bearing 5' and 3' *Tol2* transposition sequences⁴⁴. A CAG-driven vector expressing mRFP1⁴⁵ was also used in some experiments. All concentrations used are indicated in Supplementary Table 1. Detailed maps and sequences of the vectors are available upon request.

Animals. Mice were housed in a 12 hr light/12 hr dark cycle with free access to food, and animal procedures were carried out in accordance with institutional guidelines. Animal protocols were approved by the Charles Darwin animal experimentation ethical board (CEEACD/N⁵). *Transgenic CAG-Cytbow* mice were generated by pronuclear injection of a *CAG-Cytbow* transgene linearized with HindIII and MluI. *Olig2tm2(TVA,cre)Rth (Olig2^{Cre})* and *B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Hze/J (Ai9(RCL-tdT))* mice were a gift from A. Chédotal. *C57BL/6-Tg(Nes-cre/ERT2)KEisc/J (Nestin-Cre)* mice were purchased from the Jackson Laboratory.

In vivo experiments. Injections were performed with a FemtoJet microinjector (Eppendorf) (*in utero*) or mouth pipetting (postnatal). As described previously^{46,47} a CUY21EDIT electroporator (NepaGene) was used to conduct electric current with four (SWISS strains) or three (C57BL/6 strains) 50 ms pulses of 35 V for *in utero* electroporation with 1.5 to 3mm diameter Tweezerrodes (Sonidel Limited) positioned to target the dorsal wall of the lateral ventricle and five 50 ms pulses of 80 V for postnatal electroporation with 5mm diameter Tweezerrodes. When needed, recombination was induced using SeCre DNA solution, Cre mice or Cre-ER mice associated with postnatal tamoxifen (Sigma T-5648, dissolved in corn oil (Sigma)) injections or prenatal tamoxifen oral gavage. Mice were euthanized by cervical dislocation several days after electroporation to harvest embryonic brains. Pups were anesthetized with Dolethal (Vetoquinol) and perfused intracardially with Antigenfix (Diapath) for postnatal analysis. Dissected brains were postfixed 4h (embryos) or O/N (pups) at 4 °C under agitation in Antigenfix before several PBS baths. All electroporation stages and DNA solution concentrations, tamoxifen doses and stages of injection, analysis stage, mouse lines and associated genetic background used are listed in Supplementary Table 1.

Histology and immunostainings. 80 or 60 μm sections of mouse brains were obtained with a vibrating-blade microtome (Leica) following a PBS-3% agarose embedding. Immunohistology or EdU revelation (Click-it, Sigma) were performed on free floating sections with rabbit (Merck Millipore AB9610) or goat (R&D systems Bio-Techne AF2418) anti-Olig2, rabbit anti-Aldh1l1 (Abcam ab87117), rabbit anti-S100 β (Abcam ab52642) and rabbit anti-Ki67 (Abcam ab15580) primary antibodies and goat anti-rabbit Alexa Fluor 647 (Life A21245), donkey anti-goat Alexa Fluor 594 (Life A11058) or donkey anti-rabbit Alexa Fluor 647 (Jackson 711-605-152) secondary antibodies. All samples were mounted in Vectashield mounting medium (Vector Labs).

Confocal imaging. Confocal image stacks were acquired with a 20× 0.8 NA objective on an Olympus FV1000 microscope, using 405, 440, 515, 559 and 633 nm laser lines to separately

excite EBFP2, mCerulean/mTurquoise2, EYFP, tdTomato/mCherry/RFP, and Alexa Fluor 647, respectively, with a XYZ sampling of 0.62 x 0.62 x 1-1.42 μm . Isolated astrocytes were imaged using a Leica SP8 confocal system with an oil immersion objective 63X, 1.4 NA using 514 nm 554 nm laser lines for YFP and tdTomato respectively and XY resolution and Z-step size were automatically optimized based on the Nyquist theorem.

Large volume continuous imaging. Serial block-face two-photon imaging was performed on a lab-built laser scanning two-photon microscope described in (Abdeladim et al., submitted) using a water-immersion objective (25 \times 1.05 NA, XLPLN25XWMP2, Olympus) and a wavelength mixing method described in⁴⁸. Imaging depth was set from 117 to 160 μm and slicing from 80 to 120 μm with a XYZ sampling of 0.4-0.46 x 0.4-0.46 x 1.5 μm .

Image processing. In all figures, tdTomato/mCherry/RFP/ Alexa Fluor 594, EYFP, mCerulean/mTurquoise and EBFP2/Alexa Fluor 647 are respectively rendered in red (or magenta in Fig. 6f,g,i), green, blue and gray. Stitching and image display were performed using Fiji^{49,50} or Fluoview (Olympus) and Photoshop (Adobe). 3D renderings were generated using Imaris (Bitplane, Switzerland).

Clonal analysis. For serial section clonal analysis (Figures 1d-e, 4-6, Supplementary Figure 1, 4-6), all labeled astrocytes were manually pointed and their XYZ coordinates acquired (Z = section number) using Fiji's plugin TrakEM2⁵¹ from maximal intensity projections of reconstructions of 80 μm sagittal serial sections covering the electroporation area. Cytoplasmic and nuclear RGB colors were inventoried for each astrocyte and rare combinatorial cytoplasmic/nuclear clones were selected for analysis (Supplementary Figure 1c-h). Relative positions within the cerebral cortex thickness in the Y axis were obtained automatically from XYZ cell coordinates and manual drawing masks of cortical top and bottom limits using Matlab. Proliferation analysis were carried out in a similar way and distance between EdU+ astrocyte pairs were measured in 3D using XYZ cell coordinates within image stack. For tridimensional analysis (Figure 1f-k, 2-3a-c Supplementary Figure 2, 3a-c), clonal dispersion was obtained using *delaunayTriangulation* Matlab function from manually pointed astrocyte XYZ coordinates and measuring automatically all segments formed by the triangulation. The *convexHull* function allowed calculating clone's volume. Clones were automatically sorted into clusters or isolated cells using their XYZ coordinates and astrocyte mean diameter + s.d. at each developmental stage: sister cells separated from each other by distances greater than the mean diameter + s.d. were considered disconnected.

Astrocyte segmentation. 3D segmentation of individual astrocyte domains was performed on cropped isolated or color-segregated astrocytes imaged with Chrom-SMP using Imaris (Bitplane, Switzerland). Semi-automatic iso-intensity contours were drawn in all slices of the corresponding z-stack. Contours were manually drawn when the iso-intensity contour tool did not provide accurate segmentation. The obtained surfaces allowed the software to automatically calculate astrocyte domain volumes. Segmented astrocytes were then distributed into 6 equivalent bins according to their cell body relative position within the cerebral cortex thickness. Distances from cells to pial surface and VZ were manually measured to calculate cell's relative positions.

Astrocyte reconstruction. Image analysis of isolated astrocytes was performed using Fiji, Vaa3D⁵², Matlab (MathWorks, USA), and Autoquant X3.1 (Media Cybernetics, USA). Reconstructions of astrocytes were obtained using the Vaa3D-Neuron2 Auto Tracing Based

on APP2 plugin and their structure was sorted using the sort neuron SWC plugin. SWC were exported to Matlab using the TREES toolbox and the model was resized to the real dimensions from the initial acquisition. Finally, the information from the model was extracted using L-measure⁵³.

Statistics. Graphs were obtained with GraphPad Prism (USA) or Matlab (3D graphs). Statistics were done with GraphPad Prism: 2 groups and ≥ 3 groups comparisons were carried out using non parametric Mann-Whitney test and non parametric Kruskal-Wallis test associated with Dunn's multiple comparisons test, respectively. Statistics results, tests, p values and n associated to all figures are summarized in Supplementary Table 2.

Supplementary references

42. Niwa, H., Yamamura, K. & Miyazaki, J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**, 193–199 (1991).
43. Zacharias, D. A. Partitioning of Lipid-Modified Monomeric GFPs into Membrane Microdomains of Live Cells. *Science* **296**, 913–916 (2002).
44. Yoshida, A. *et al.* Simultaneous expression of different transgenes in neurons and glia by combining *in utero* electroporation with the *Tol2* transposon-mediated gene transfer system. *Genes Cells* (2010). doi:10.1111/j.1365-2443.2010.01397.x
45. Campbell, R. E. *et al.* A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 7877–7882 (2002).
46. Loulier, K. *et al.* beta1 integrin maintains integrity of the embryonic neocortical stem cell niche. *PLoS Biol.* **7**, (2009).
47. Boutin, C., Diestel, S., Desoeuvre, A., Tiveron, M.-C. & Cremer, H. Efficient In Vivo Electroporation of the Postnatal Rodent Forebrain. *PLoS ONE* **3**, (2008).
48. Mahou, P. *et al.* Multicolor two-photon tissue imaging by wavelength mixing. *Nat. Methods* **9**, 815–818 (2012).
49. Preibisch, S., Saalfeld, S. & Tomancak, P. Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics* **25**, 1463–1465 (2009).
50. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
51. Cardona, A. *et al.* TrakEM2 Software for Neural Circuit Reconstruction. *PLoS ONE* **7**, e38011 (2012).
52. Peng, H., Bria, A., Zhou, Z., Iannello, G. & Long, F. Extensible visualization and analysis for multidimensional images using Vaa3D. *Nat. Protoc.* **9**, 193–208 (2014).
53. Scorioni, R., Polavaram, S. & Ascoli, G. A. L-Measure: a web-accessible tool for the analysis, comparison and search of digital reconstructions of neuronal morphologies. *Nat. Protoc.* **3**, 866–876 (2008).

LEGENDS

Figure 1: Multi-clonal analysis of cortical astrocytes with the MAGIC Markers strategy and Chrom-STP reveals highly variable clonal patterns

(a) MAGIC Markers constructs for integrative combinatorial labeling: transgenes express nuclear EBFP2 by default under the control of a CAG promoter. Three recombination possibilities are obtained by alternated pairs of incompatible *lox* sites triggering the expression of a distinct FP: mCerulean/mTurquoise2, mEYFP, or tdTomato/mCherry in

specific subcellular compartments: cytoplasm ($^{PB}Cytbow$) or nucleus ($^{T2}Nucbow$). 5' and 3' Tol2 (T2) or PiggyBac (PB) transposition sequences frame the transgenes. (b) 64 theoretical color combinations are possible in cells containing up to 3 copies of both $^{PB}Cytbow$ and $^{T2}Nucbow$. (c) MAGIC Markers are used to mark astrocyte clones arising from distinct cortical progenitors. (d) E15 IUE of MAGIC Markers, Self-excisable Cre (SeCre) and both PB and Tol2 transposases labels astrocytes among other cell types at P7 and P21 in all layers of the mouse cerebral cortex. (e) Rare color combinations allow the distinction of astrocyte clones. (f) Chromatic serial multiphoton microscopy (Chrom-SMP) relies on the integration of trichromatic two-photon excitation by wavelength mixing with automated serial tissue sectioning. (g-h) Chrom-SMP microscopy allows high-resolution 3D and large volume imaging of astrocyte clone spatial distribution (i-j) in continuous volumes of mouse cerebral cortex. (k) Selections of single clones plotted in (j) with various sizes and spatial distributions. Hipp.: hippocampus, DV: dorsoventral axis, AP: anteroposterior axis, ML: mediolateral axis. Scale bars: 100 (d, g, i); 200 (h); 50 (e) μm .

Figure 2: Analysis of astrocyte clones tridimensional organization and connectivity

(a) 3D analysis of PrA clone dispersion reveals no difference from P7 to P21, with a higher dispersion in the DV axis (n=113). (b) Dispersion of PrA clones along the AP, DV and ML axis is variable from one clone to another at P7 and P21 and can reach 0,5 mm along the ML and AP axis and 1.25 mm along the DV axis. (c) XYZ coordinates of sister cells belonging to clones ≥ 4 cells (here an example of a 17 cells clone where red spheres represent nuclei and gray spheres the astrocyte territories) allows the use of Delaunay Triangulation to calculate cell dispersion and clone volume after ConvexHull extraction. (d) Delaunay Triangulation of random clones highlights the various distinct shapes displayed by the PrA clones. (e) ConvexHull analysis shows that clone volumes are heterogeneous and stable from P7 to P21. (f) PrA clones were automatically separated into clusters or isolated cells using their XYZ coordinates and astrocyte mean diameter + s.d. at each stage. (g) On average PrA clones are composed of 2.846 disconnected elements (clusters or isolated cells) and is stable from P7 to P21. (h) 76.22% of PrA belong to clusters within clones and this is stable from P7 to P21. DV: dorsoventral axis, AP: anteroposterior axis, ML: mediolateral axis. Means \pm s.e.m. Scale bar: 50 μm .

Figure 3: Frontier segmentation and high resolution reconstruction of individual cortical astrocytes reveals an increase in their territorial volume and complexity between P7 and P21

(a) Chrom-SMP microscopy allows plan by plan astrocyte segmentation and volume analysis of color isolated cells. (b) Astrocyte segmentation shows that their territorial volume increase by 65% from P7 to P21. (c) Astrocyte territorial volumes increase from P7 to P21 within the entire cortical parenchyma which is divided in six equivalent bins (Bin 1 = pial surface). (d) High resolution reconstruction of astrocyte arborizations reveals a significant increase in branches number from P7 to P21 (e). (f) Total branch length increases from P7 to P21 as well as the model volume (g) (h) Close-ups of neighboring color isolated PrA from single confocal plans show incomplete filling of cortical space by P7 PrAs compared to P21 PrAs, excluding neuronal cell body areas. Means \pm s.e.m. VZ: ventricular zone. Scale bars: 20 μm .

Figure 4: Normal resting cortical astrocyte clones are heterogeneous in terms of cell number and subtypes generated

(a) PrA clones display various sizes at P4, P7 and P21 after IUE of MAGIC Markers at E15. (b) PrA clones issued from cortical progenitors targeted at E15 grow from 4 cells at P4 to 8 cells at P7 and remain stable until P21. (c) PrA clones exhibit various sizes at P4, P7 and P21, with clones composed of 1 to 42 cells. (d) Homogeneous clones of PrA (d) or PiA (e) and heterogeneous clones, containing both astrocyte types (f), were found in stable proportions (respectively 76, 5 and 19% of clones) during postnatal development (P4-P7-P21), with a significant majority of homogeneous PrA (g). (h) The number of cells is significantly higher in heterogeneous astrocyte clones than in homogeneous PrA clones. (i) The calculation of PrA clone DV barycenter reveals that upper cortical layers (U) clones (<50% of DV cortical thickness) are bigger than lower layer (L) clones ($\geq 50\%$ of DV cortical thickness) at P4, P7 and P21. Clone barycenters are calculated using the mean of sister cells relative positions, excluding pial astrocytes for heterogeneous clones. (j) Intermediate morphologies between PiA and PrA observed at P21: several iterations of astrocytes exhibit intermediate phenotype including both fibroblast-like feature at one extremity and bushy ramifications at the other extremity. DV: dorsoventral. Means \pm s.e.m. Scale bars: 50 μ m.

Figure 5. The first postnatal week constitutes the dynamic phase of astroglialogenesis including proliferation and spatial dispersion

(a) PrA clones display various spatial arrangements (clusters, columns, combinations of both) at P4, P7 and P21 after IUE of MAGIC Markers at E15. (b) Schematic view of DV, ML and AP dispersion on serial sagittal sections. (c) DV dispersion per cell in % of cortical thickness (DV clonal dispersion/ clone size) decreases from P4 to P7. (d) ML dispersion per cell in μ m (ML clonal dispersion/ clone size) decreases from P4 to P7. (e-f) DV and ML dispersions of PrA clones ≥ 2 cells as a function of clone size are broad and variable. (g) Proliferating PrA are found at P4 and P7 48h or 24h post-EdU injections in the entire cortical wall labeled with MAGIC Markers at E15. (h) EdU+ PrA astrocyte can be paired thanks to their color markers. (i) Distance between EdU+ paired PrA decreases from 48h to 24h post-injection and decreases from P4 to P7. (j) Sister cells separated by a distance < astrocyte nucleus mean size (6 μ m) form doublets. (k) Doublets of PrA were found at P4 and P7 in stable proportions (20%). (l) 11% of labeled PrA are EdU+ at both P4 and P7 whereas this proportion drops from 23 to 9% for PiA. (m) Model of astrocyte clonal maturation through densification between P4 and P7. DV: dorsoventral, ML: mediolateral, AP: anteroposterior. Means \pm s.e.m. Scale bars: 50 (a), 100 (g), 20 (h, j) μ m.

Figure 6. Cortical astrocytes arise from Olig2+ seeding units issued from two distinct pools of embryonic and postnatal progenitors.

(a) MAGIC Markers labeling using E15 IUE shows colocalization of multicolor cells with Olig2 marker (stars) at P1 and none with S100 β marker. (b). The percentage of Olig2+ cells among cells labeled with MM increases from E18 to P0 (5 to 10%) and is stable until P1 while the one of S100 β + cells remains null. (c) IUE of MM in *Olig2^{Cre}* mice at E13 results in labeling of astrocyte-like cells at P7 both at the pial surface and in the cortical parenchyma. (d) Immunostainings on serial sections show co-labeling of a MM+ clone encompassing S100 β , Aldh1L1 and Olig2 cells at P7. (e) IUE of MM in E13 *Olig2^{Cre}* embryos produces sparse recombined cells at E18 even though numerous cells express nuclear EBFP2, a readout of absence of recombination. (f) Olig2+/Aldh1L1+ cells are found scattered in the E18 cerebral cortex after E15 IUE of integrative Tol2mEYFP vector. (g) P1 co-electroporation of episomal CAG-RFP and integrative *Tol2*CAG-EYFP vectors labels few astrocytes expressing RFP and markedly more expressing *Tol2*CAG-EYFP at P7, from both protoplasmic and pial subtypes

(arrows). (h) P0 electroporation of SeCre plasmid in CAG-Cy5bow mice shows clonal labeling of PrA and PiA (arrows) at P7. PrA identity is confirmed by S100 β immunostaining (stars). (i) P0 electroporation of integrative ^{Tol2}CAG-EYFP plasmid labels YFP+/Olig2+/Aldh1L1+ cells scattered in the entire cortical thickness at P3. MM: MAGIC Markers. Mean \pm s.e.m. Scale bars: 50 (a, d), 100 (c, e-i) μ m.

Figure 7. A new model for astrocyte development in the mouse cerebral cortex

Until now the accepted model of mouse cortical astrocyte development consisted of a first phase where embryonic progenitors colonize the neocortical wall followed by a second step relying heavily on local proliferation of these first progenitors settlers after birth, the contribution of postnatal progenitors being still debated. Here we propose that mouse cortical astrocytes are issued from a dual contribution of delaminated embryonic apical progenitors and postnatal Nestin+ progenitors. Furthermore our data show that during the first postnatal week (P0-P7) both pre- and postnatal progenitors scatter throughout the neocortical wall while proliferating actively and filling up the space inside clonal boundaries. This dynamic phase is followed by a maturation phase (P7-P21) where the clones stop both expansion and proliferation while individual astrocytes increase their volume and the complexity of their processes.

Figure S1. Mouse *in utero* electroporation of MAGIC Markers allows clonal astrocyte labeling and analysis.

(a) In absence of Cre, mouse IUE of MAGIC Markers at E15 no recombined astrocytes are present at P7 (EBFP2 is expressed by default and used as electroporation control). In the absence of transposases, pyramidal neurons located in layers 2-3 are labeled but no cortical astrocytes express FPs. In presence of both Cre and transposases, cortical astrocytes are efficiently labeled among other cell types. (b) Without transposases, episomal vectors are diluted prior to astrocyte production whereas vector integration results in astrocyte labeling expressing only stable markers. (c) Inventory of observed color combinations (n=12 animals, 57,535 cells) enables to calculate their frequency (d) over the total number of cells. (e) Color combination frequency permits to restrict the clonal analysis to nucleus-cytoplasm color combinations, each one representing less than 2% of labeled astrocytes. (f) Unique RGB combinations found within single animals have been used to establish a continuity index beyond which two cells will not be considered clonally-related. (g) The maximal distance between neighboring sister cells in unique clones is <600 μ m and therefore used as our continuity index. (h) A clone is defined by its RGB distribution in both cytoplasm and nucleus (presence or absence of FPs in each compartment), its final color display, and a maximal distance of 600 μ m from one sister cell to another. Mean \pm s.d. Scale bars: 100 (a), 50 (c,f) μ m.

Figure S2. 3D clonal analysis of protoplasmic astrocyte clones reveals a stable spatial organization from P7 to P21

(a) Size of all segments (with red marks) formed by Delaunay triangulation in each clone is used to estimate astrocyte clonal dispersion. (b) In each clone, mean size of these segments reveals a stable dispersion of sister cells from P7 to P21. (c) ConvexHull analysis shows that clone volumes are stable from P7 to P21 but variable and globally related to clone size. (d) Connectivity diagrams of P7 and P21 astrocyte clones reveal variable clonal organizations. Each gray sphere represents the domain of one sister cell (sphere size is based on mean astrocyte diameter at each developmental stage) and its nucleus (in red, based on nucleus

mean size at each stage). Sister cells at a distance $<$ PrA mean diameter + s.d are considered connected and linked by a blue line. DV: dorsoventral. Mean \pm s.e.m.

Figure S3. Semi-automated 3D segmentation and high resolution tracing of isolated PrA reveals their morphological heterogeneity at the single cell level.

(a) Semi-automated segmentation of isolated PrA enables fine reconstruction of astrocytes morphology and extraction of volume and surface (b) of multiple PrA (n=193). (c) The cortical parenchyma is divided in six equivalent bins (Bin 1 = pial surface) for PrA volume comparisons. (d-e) High resolution imaging and tracing of multiple cortical PrA highlight the morphological heterogeneity and cellular complexity of cortical astrocytes. (f) ConvexHull volume of PrA models increases significantly from P7 to P21 (g). Mean \pm s.e.m. Scale bars (μ m): 50 (a-b), 100 (c), 10 (d).

Figure S4. Cortical progenitors generate heterogeneous types of clones composed of different astrocyte subtypes

(a) Representative scheme of the three classes of astrocyte clones found in the mouse cerebral cortex: homogeneous PrA, homogeneous PiA and heterogeneous clones containing both PrA and PiA subtypes. (b) PiAs display various morphologies and can be separated in two categories: protoplasmic-like cells and fibrous-like cells. (c) Astrocytes are located within the cerebral cortex thickness (DV axis) using their relative position between the pial surface and the VZ (relative position = $d(\text{VZ-cell}) / d(\text{VZ-pial surface}) * 100$). Linear regression of the relative position of astrocyte clone barycenters as a function of clone size show that astrocyte clones are growing larger as they are located closer to the pial surface (represented at 100% of the cortical thickness). DV: dorsoventral. Scale bar: 50 μ m.

Figure S5. Astrocytes doublets are not a reliable proliferative feature and astrocyte proliferation decreases drastically between P4 and P7 for both PrA and PiA subtypes.

(a) All doublets found at P4-P7 are not Ki67+ cycling cells. (b) At P21, numerous doublets can still be found even though astrocytes are not proliferating at this stage. (c) At all three stages, doublet proportion among astrocytes labeled with complex color combinations remains stable whereas astrocyte proliferation drops drastically between P4 and P21. (d) Doublet relative positions in % of cortical thickness show that they are found in the entire cortical parenchyma from P4 to P21 whereas EdU+ astrocyte pairs are located mostly in the upper cortical layers (e). (f) The percentage of Ki67+ cells among astrocytes labeled with MAGIC Markers is halved between P4 and P7 for both PrA and PiA subtypes. MM: MAGIC Markers. Means \pm s.e.m. Scale bars: 50 μ m.

Figure S6. Cortical astrocytes are issued from a dual contribution of embryonic delaminated apical progenitors and postnatal Nestin+ progenitors and go through the Olig2 lineage.

(a) E13 IUE of MM results in a dense labeling at P21 where 61, 5, 27 and 6% of labeled cells belong to PrA, PiA, other glial cells and neurons respectively (b). (c) 4 months old *Olig2^{cre};CAG-Cytbow;CAG-Nucbow* animals display astrocyte-like cell coverage of the cerebral cortex. Astrocyte identity is confirmed by S100 β immunostaining. (d) *Nestin-Cre/ERT2;Ai9* embryos were electroporated at E15 with an integrative *Tol2*CAG-EYFP plasmid and injected with tamoxifen at P0 to analyze at P7, in the same animals, the proportions of cortical astrocytes issued from i) embryonic delaminated progenitors (*Tol2*CAG-EYFP+ prenatal contribution in green), ii) apical progenitors mitotically active during

embryogenesis that remain at the dorsal ventricular surface to be part of Nestin+ SEZ postnatal progenitors ($^{Tol2}CAG-EYFP+/dtTomato+$ postnatal contribution in orange), iii) SEZ Nestin+ postnatal progenitors (non-electroporated dtTomato+ labeled cells in red). (e) IUE of $^{Tol2}CAG-EYFP$ plasmid at E15 and tamoxifen injection at P0 in *Nestin-Cre/ERT2;Ai9* mice results in labeling of cortical astrocytes with $^{Tol2}CAG-EYFP+$ cells (green) and $^{Tol2}CAG-EYFP+/dtTomato+$ (yellow) issued from delaminated embryonic and postnatal progenitors respectively. (f) Mean relative position of $^{Tol2}CAG-EYFP+$ and $^{Tol2}CAG-EYFP+/dtTomato+$ astrocytes per animal shows that postnatal progenitors produce PrA which are located slightly higher in the cortical parenchyma than PrA produced by embryonic progenitors. (g) Proportions of $^{Tol2}CAG-EYFP+$ and $^{Tol2}CAG-EYFP+/dtTomato+$ astrocytes per animal show that both embryonic and postnatal progenitors produce around 40% of PrA and 10% of PiA. Means \pm s.e.m. Scale bars: 100 (a, b, e), 50 (c) μ m.

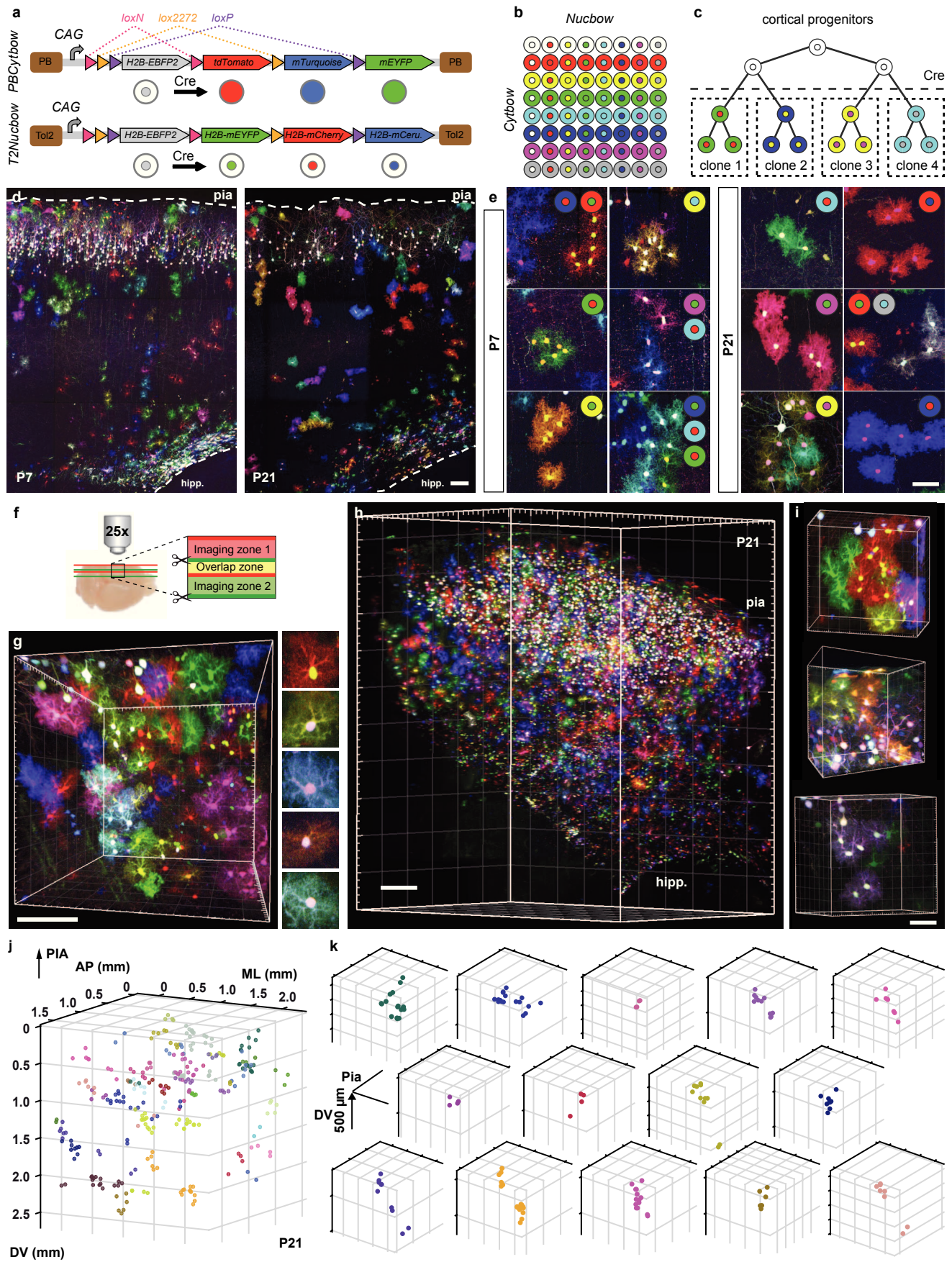


Figure 1

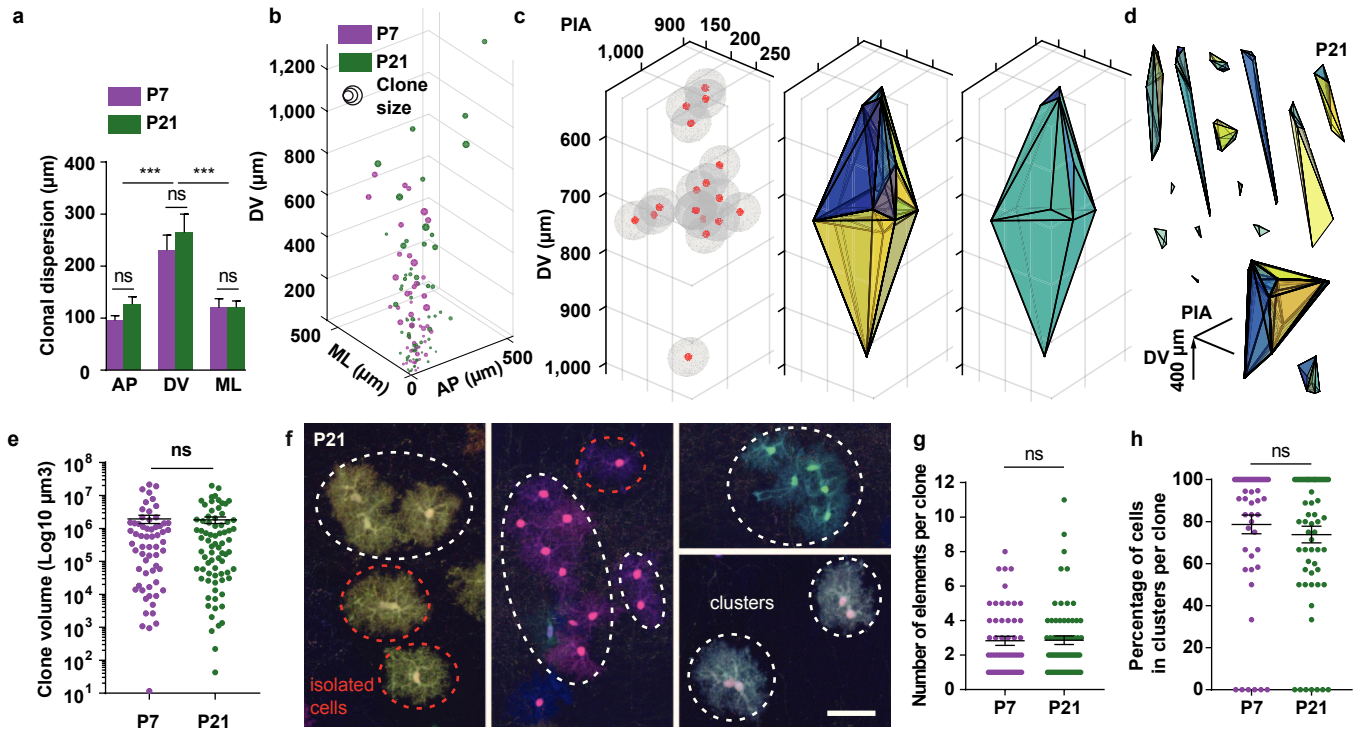


Figure 2

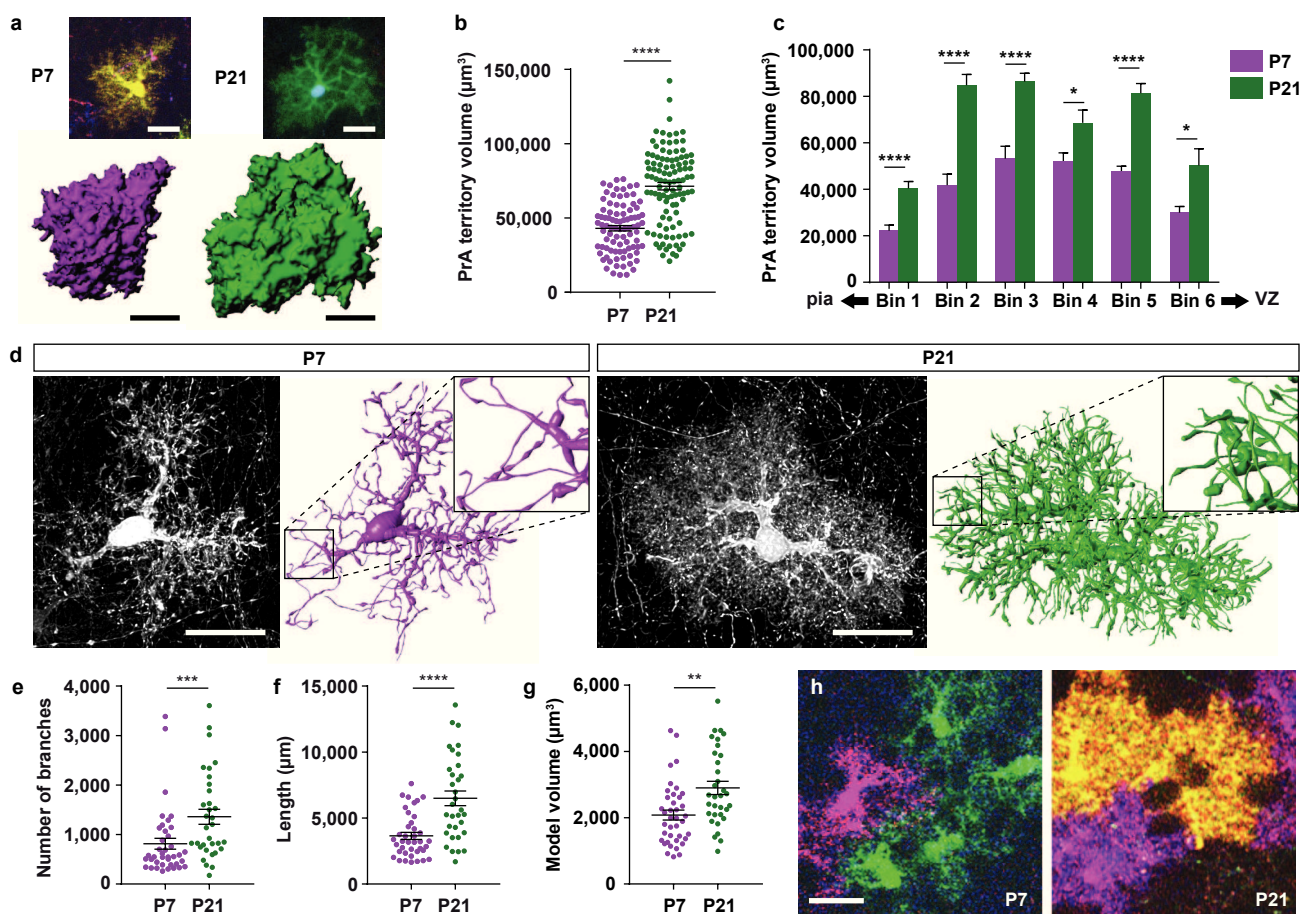


Figure 3

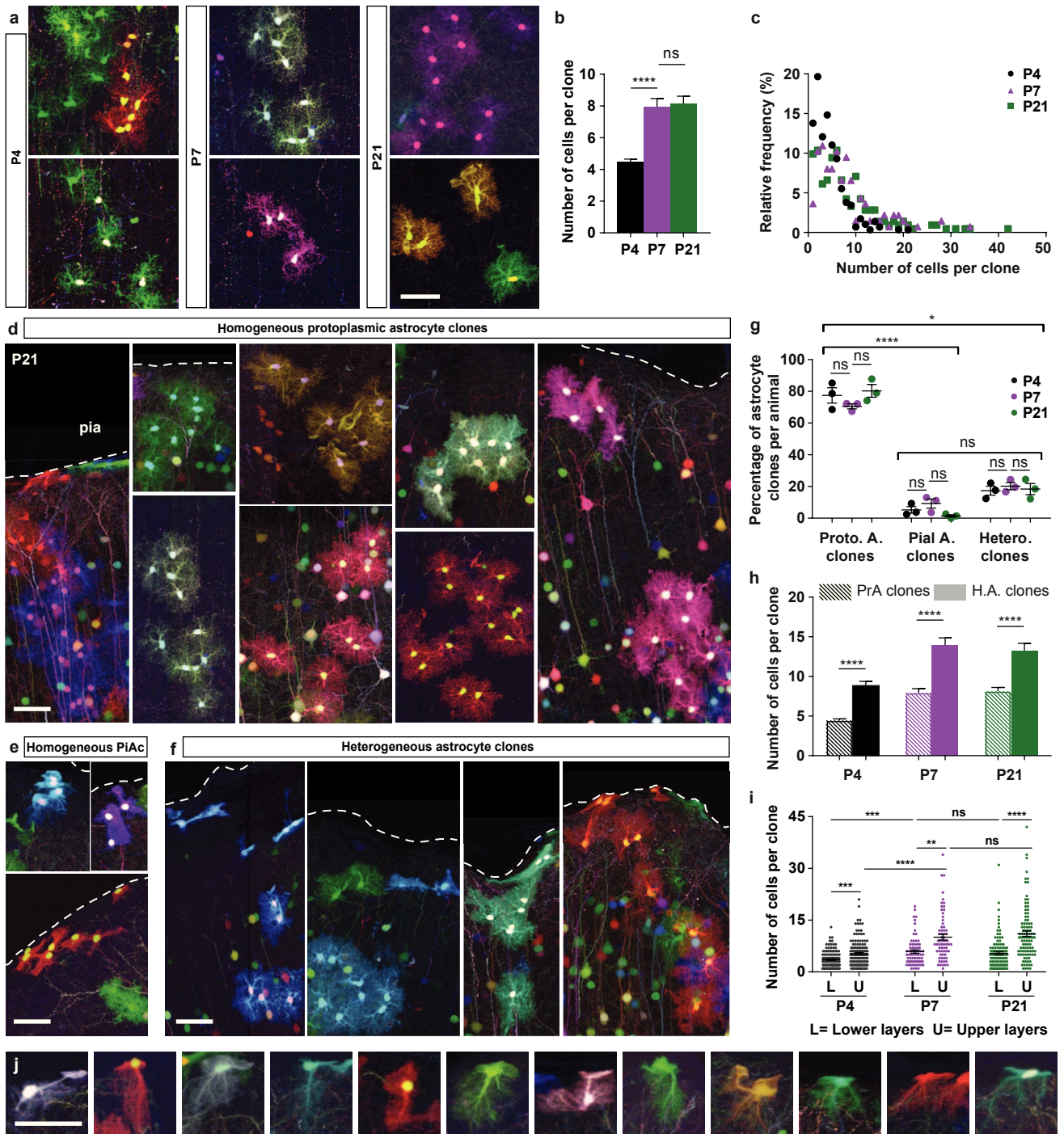


Figure 4

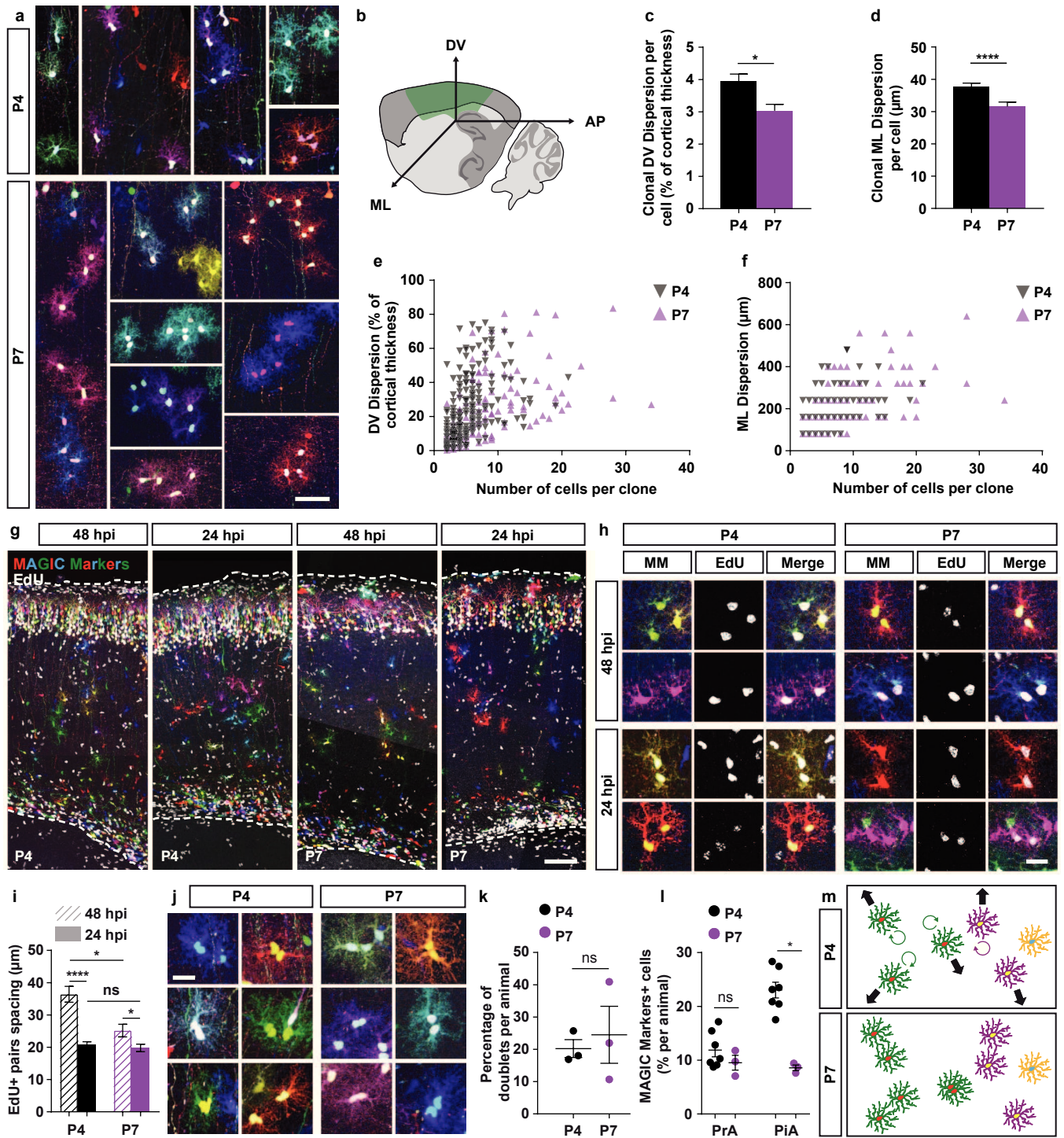


Figure 5

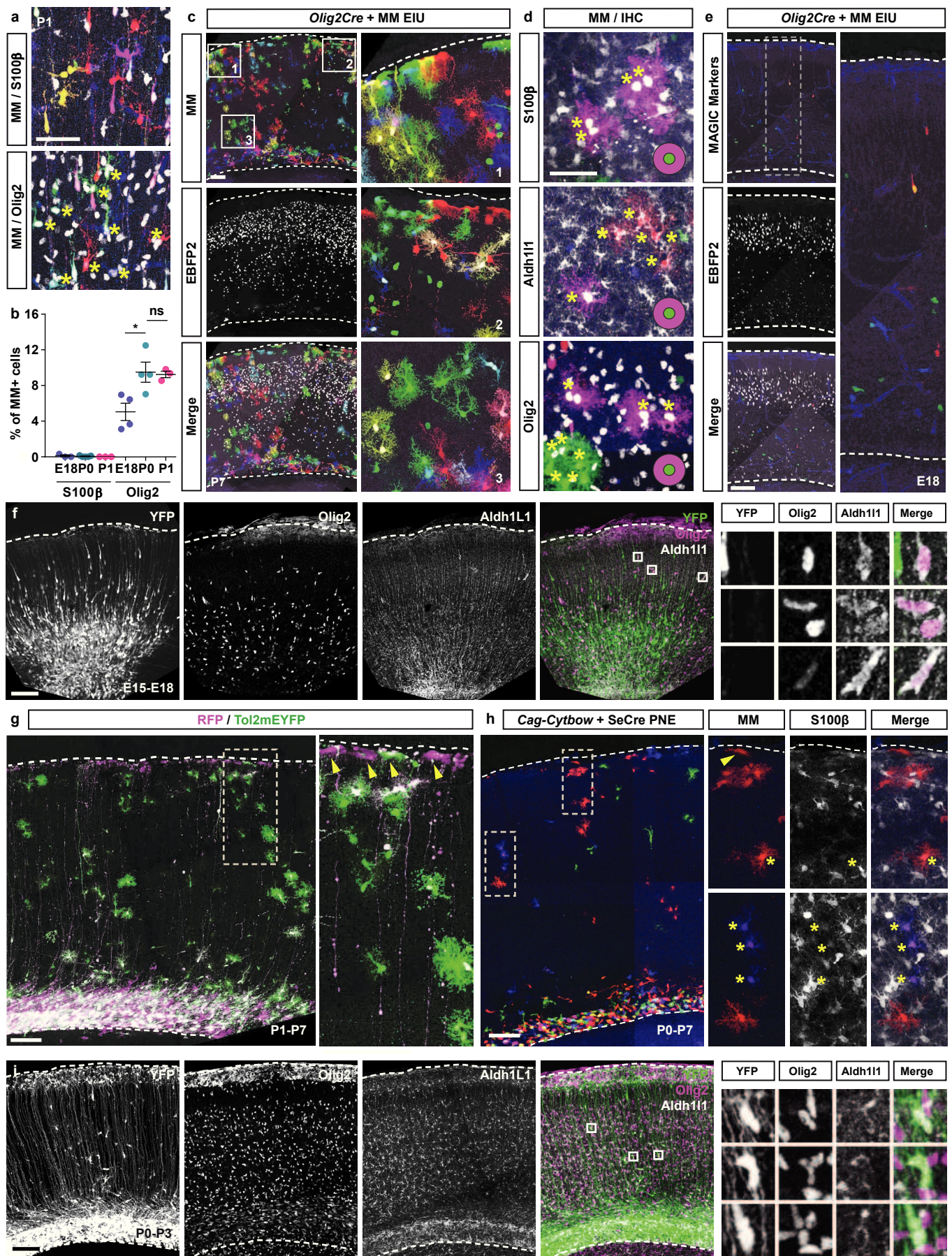
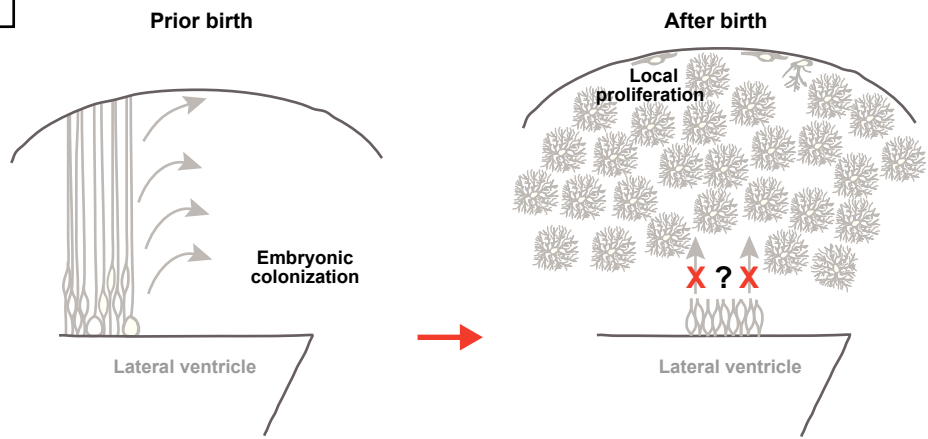


Figure 6

Previous model



New model

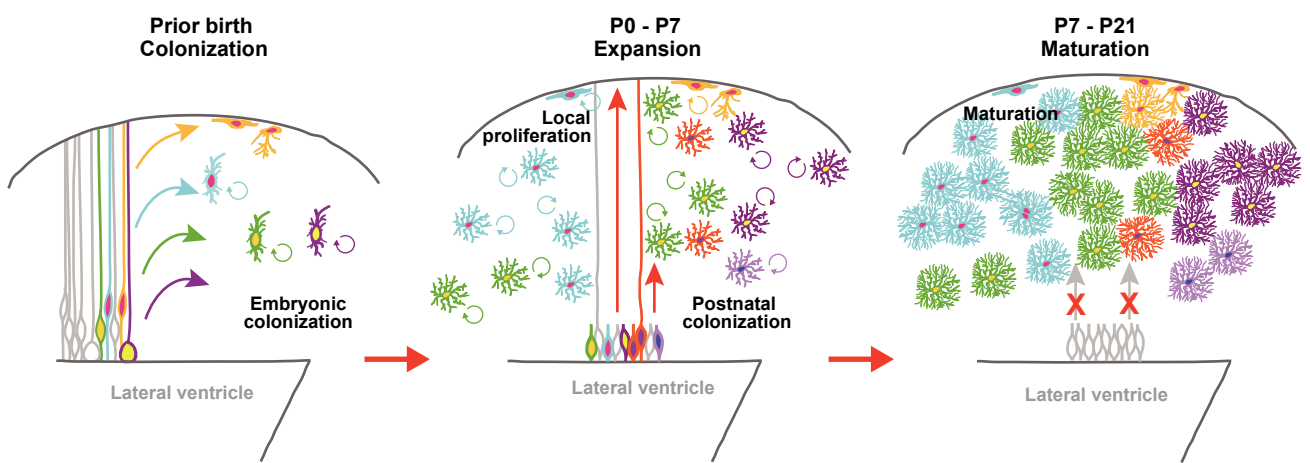
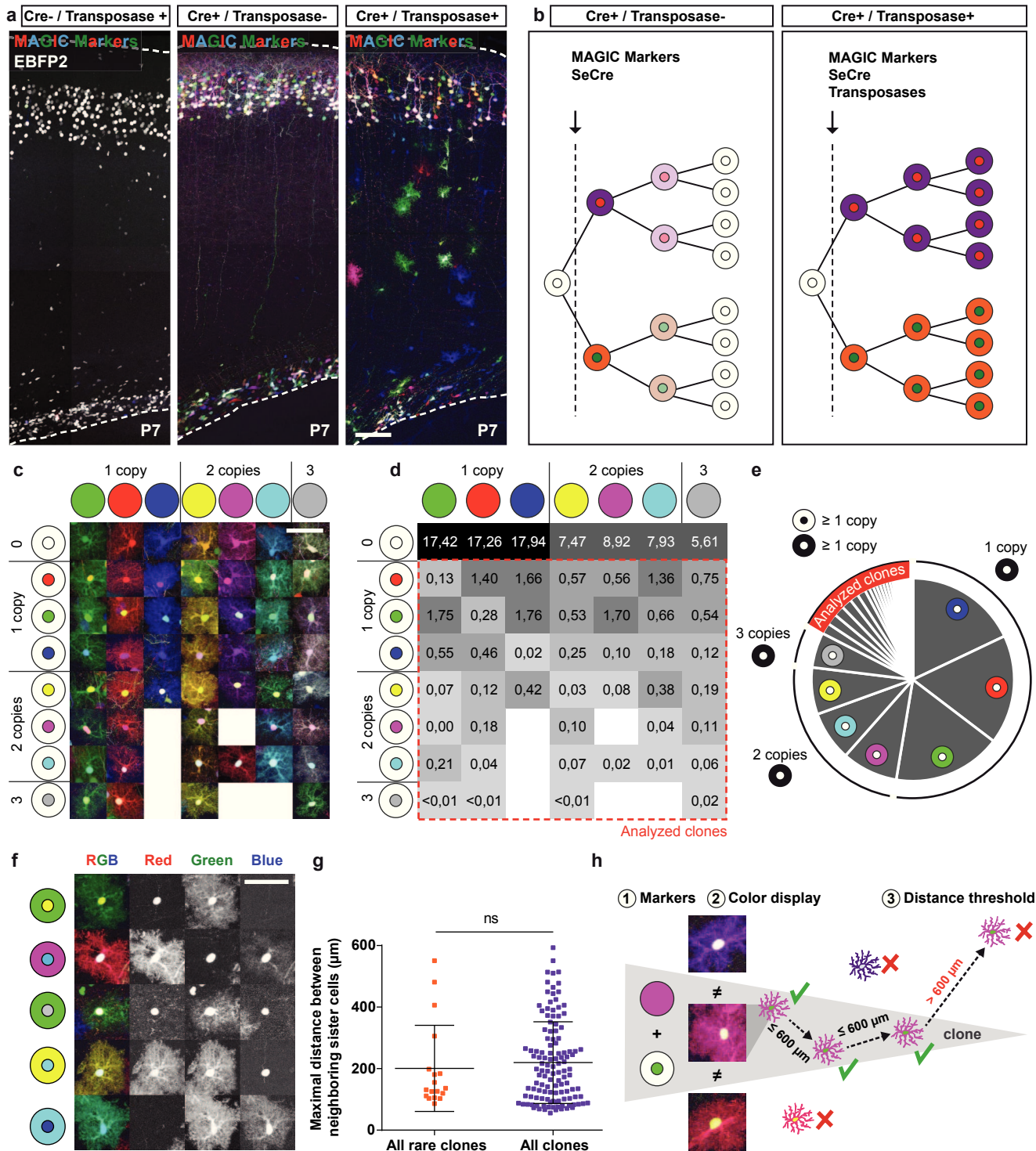
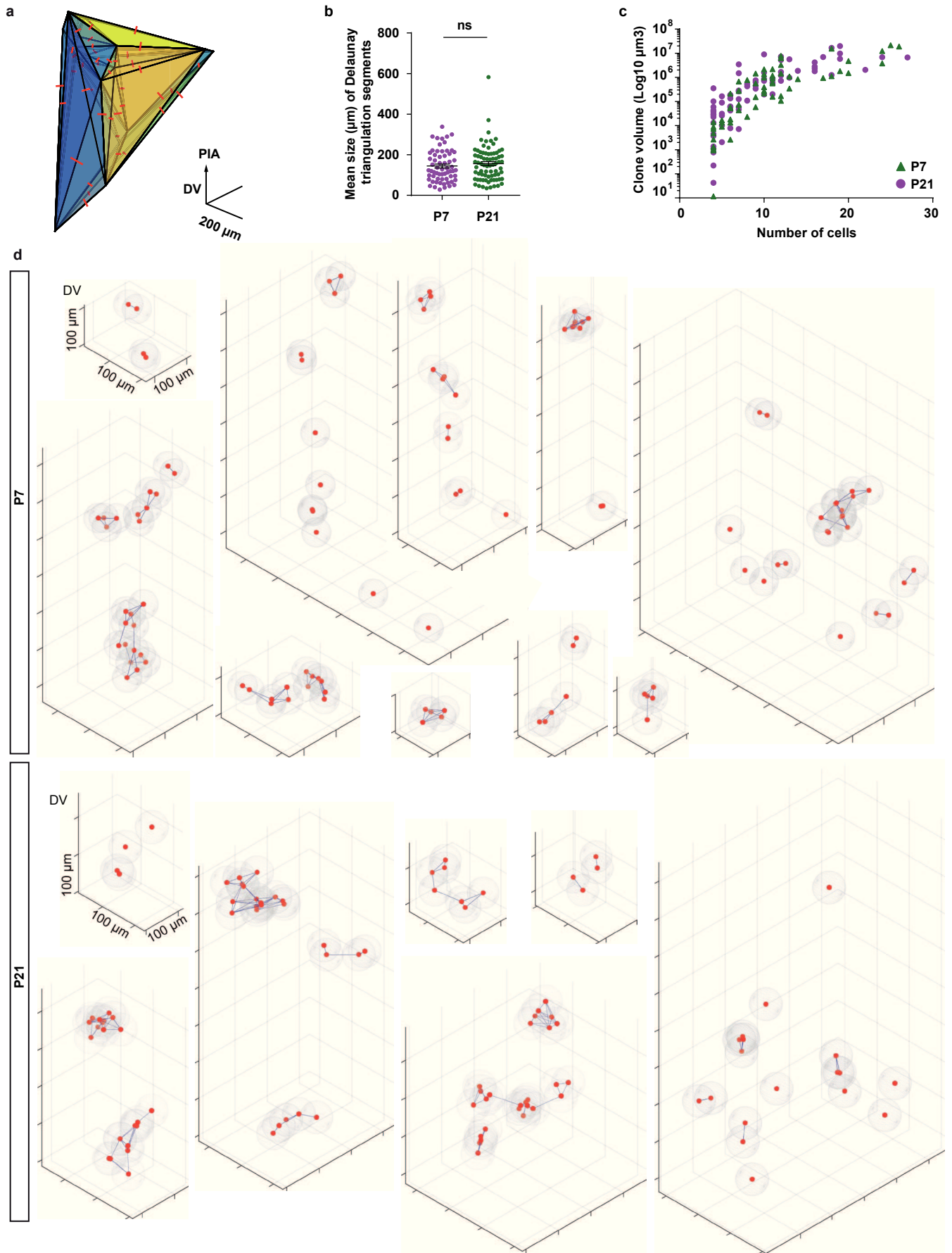


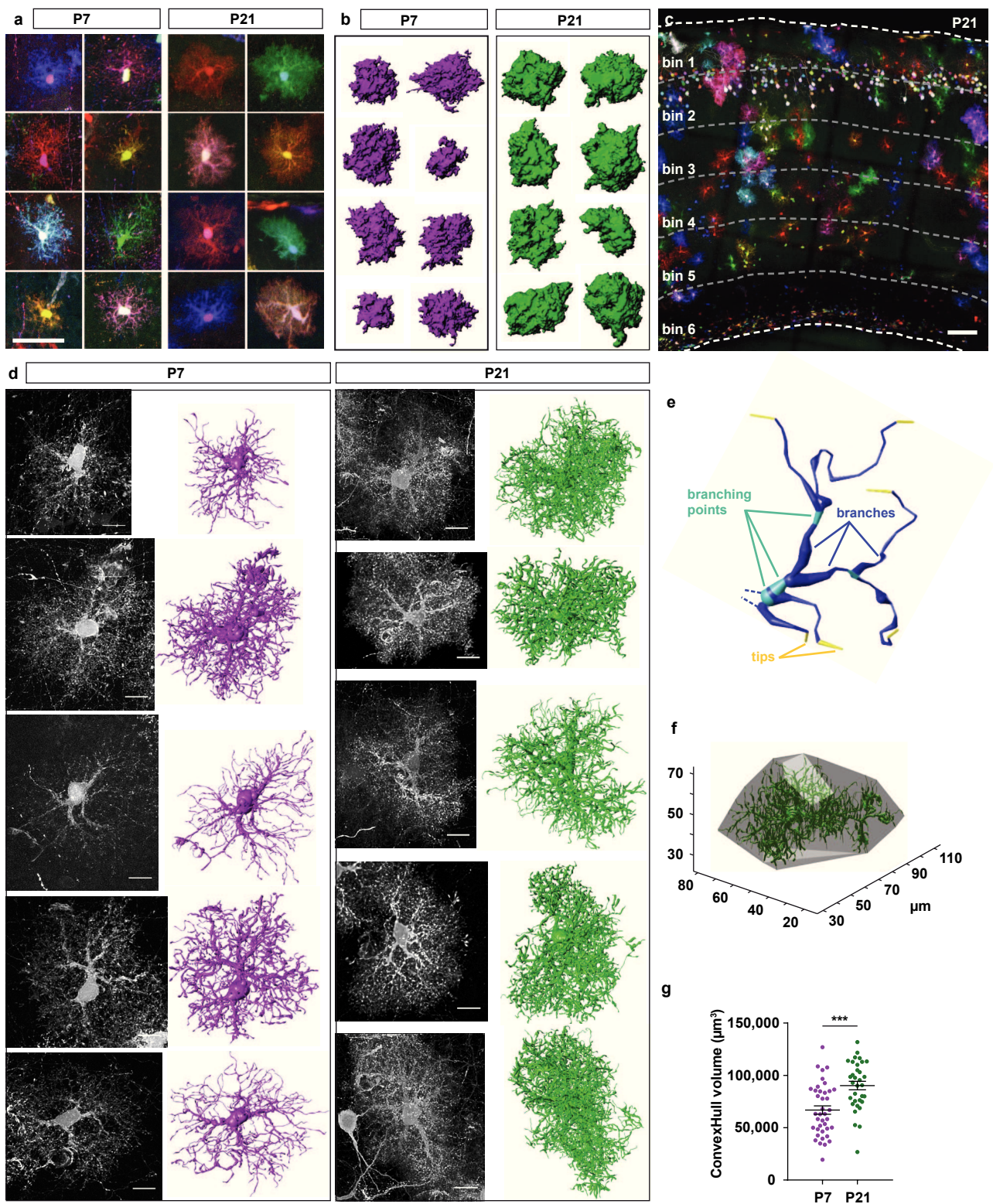
Figure 7



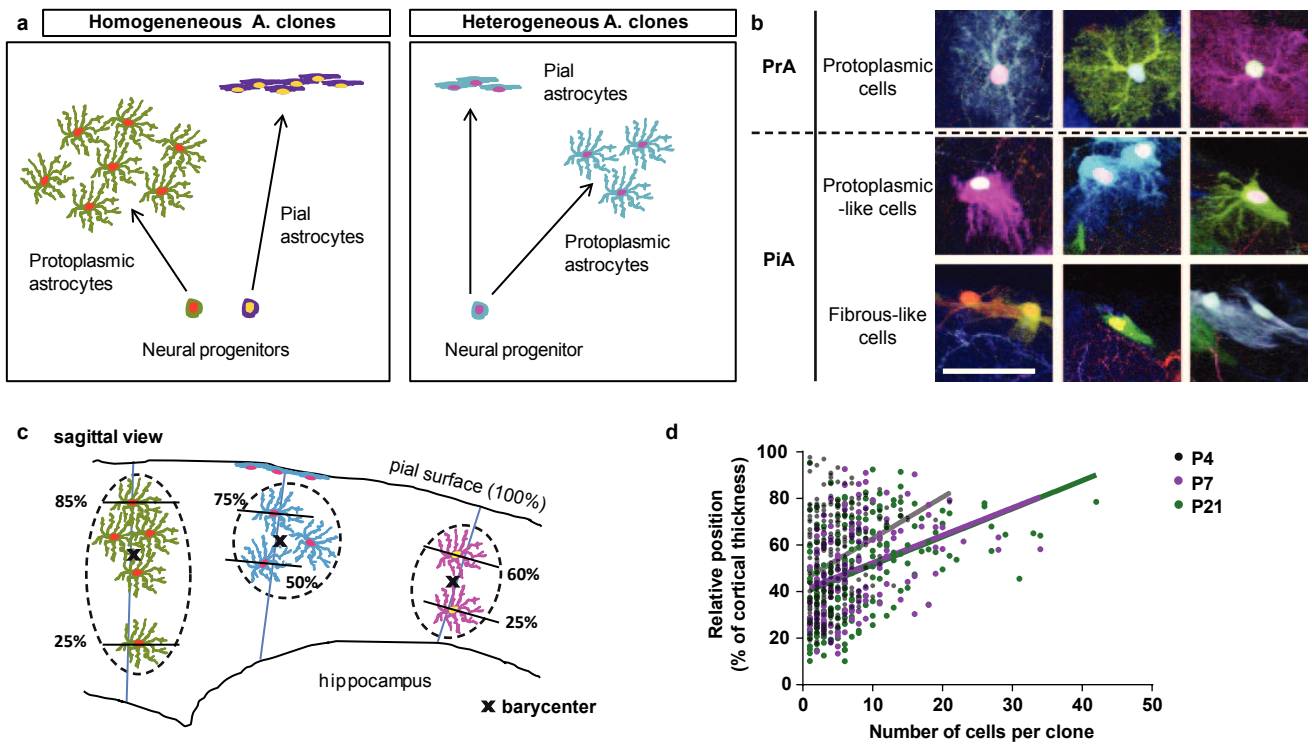
Supplementary Figure 1



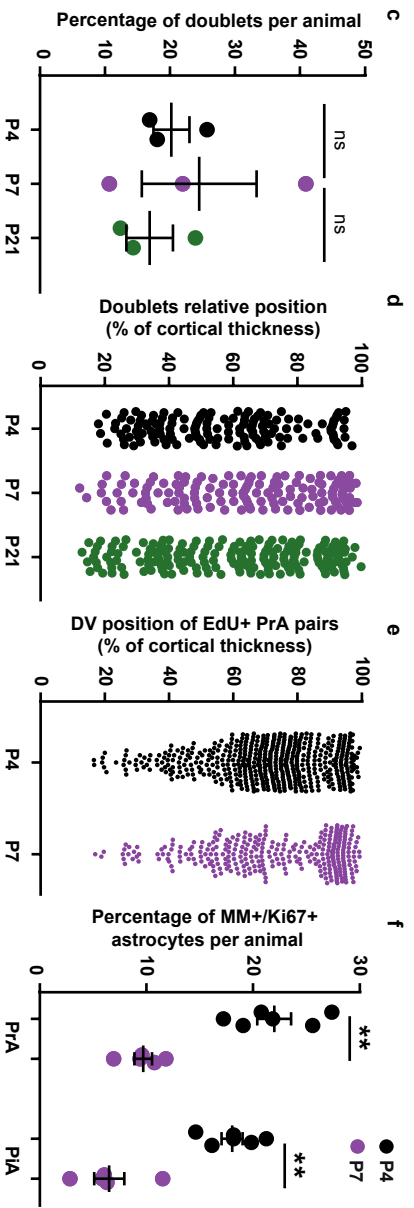
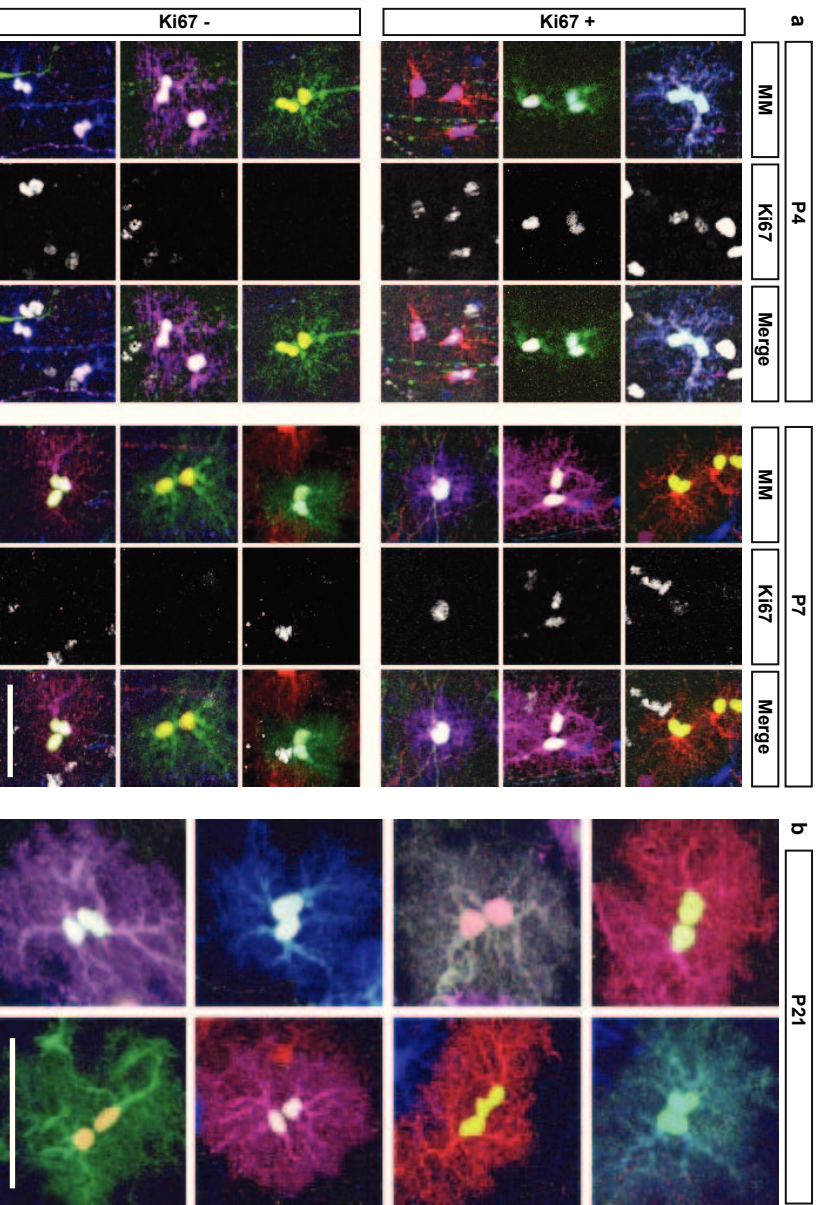
Supplementary Figure 2



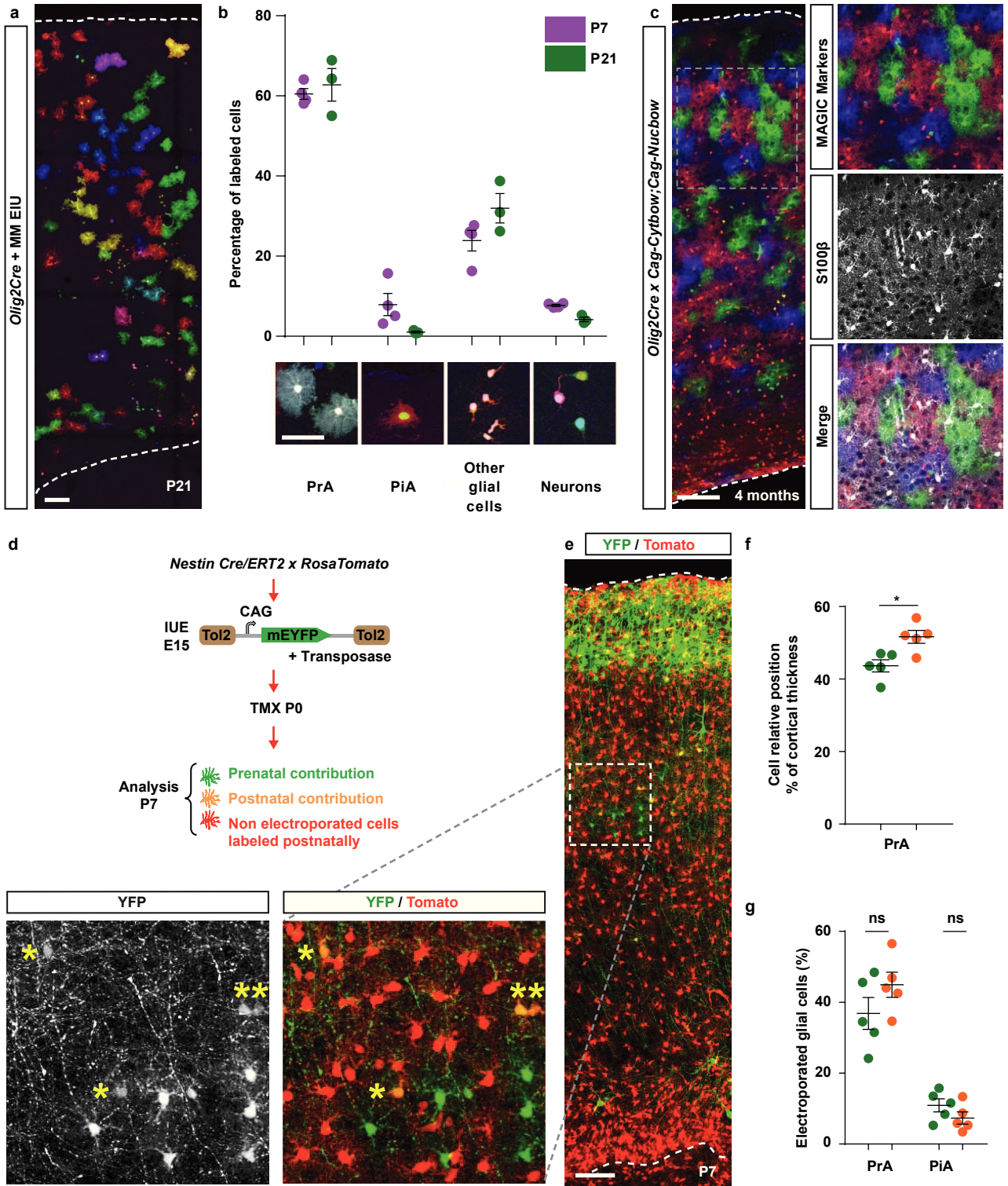
Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 6

Supplementary Table 1

Figure	Analysis	Imaging method	Elec. stage	Mouse line	Genetic Background	[PBCytbow]	[ToI2*Nucbow]	[PB transposase]	[ToI2 transposase]	[SeCre]
4/5a-f, j- I/S4e/S4d/S5b-d	P4	Serial sections	E15	WT	Swiss	0,8 µg/µl	0,8 µg/µl	0,4 µg/µl	0,4 µg/µl	0,16 µg/µl
1d,e/2/3d-h/4/5a-f, j- I/S3d-g/S4d/S5c-d	P7	Serial sections	E15	WT	Swiss	0,8 µg/µl	0,8 µg/µl	0,4 µg/µl	0,4 µg/µl	0,16 µg/µl
1d,e/3d-h/4/S3d- g/S4b,d/S5b-d	P21	Serial sections	E15	WT	Swiss	0,8 µg/µl	0,8 µg/µl	0,4 µg/µl	0,4 µg/µl	0,16 µg/µl
1f-k/2/3a-c/S2/S3a-c	P7	Chrom-SMP	E15	WT	Swiss	0,8 µg/µl	0,8 µg/µl	0,4 µg/µl	0,4 µg/µl	0,16 µg/µl
1f-k/2/3a-c/S2/S3a-c	P21	Chrom-SMP	E15	WT	Swiss	0,8 µg/µl	0,8 µg/µl	0,4 µg/µl	0,4 µg/µl	0,16 µg/µl
5g-i/S5a,e,f	P4	Serial sections	E15	WT	Swiss	0,8 µg/µl	1,0 µg/µl	0,4 µg/µl	0,5 µg/µl	0,18 µg/µl
5g-i/S5a,e,f	P7	Serial sections	E15	WT	Swiss	0,8 µg/µl	1,0 µg/µl	0,4 µg/µl	0,5 µg/µl	0,18 µg/µl
6a,b	E18	Serial sections	E15	WT	Swiss	0,8 µg/µl	0,8 µg/µl	0,4 µg/µl	0,4 µg/µl	0,16 µg/µl
6a,b	P0	Serial sections	E15	WT	Swiss	0,8 µg/µl	0,8 µg/µl	0,4 µg/µl	0,4 µg/µl	0,16 µg/µl
6a,b	P1	Serial sections	E15	WT	Swiss	0,8 µg/µl	0,8 µg/µl	0,4 µg/µl	0,4 µg/µl	0,16 µg/µl
6h	P7	Serial sections	P0	<i>CAG-Cytbow</i>	<i>C57BL/6</i>	-	-	-	-	0,80 µg/µl
S1a (CTL Cre-)	P7	Serial sections	E15	WT	Swiss	0,8 µg/µl	0,8 µg/µl	0,4 µg/µl	0,4 µg/µl	-
S1a (CTL Tp-)	P7	Serial sections	E15	WT	Swiss	0,8 µg/µl	0,8 µg/µl	-	-	0,16 µg/µl
6c,d	P7	Serial sections	E13	<i>Olig2tm2(TVA,cre)Rth</i>	<i>C57BL/6</i>	0,8 µg/µl	0,8 µg/µl	0,4 µg/µl	0,4 µg/µl	-
6e	E18	Serial sections	E13	<i>Olig2tm2(TVA,cre)Rth</i>	<i>C57BL/6</i>	0,8 µg/µl	0,8 µg/µl	0,4 µg/µl	0,4 µg/µl	-
S6b,c	P21	Serial sections	E13	<i>Olig2tm2(TVA,cre)Rth</i>	<i>C57BL/6</i>	0,8 µg/µl	0,8 µg/µl	0,4 µg/µl	0,4 µg/µl	-

Figure	Analysis	Imaging method	Elec. stage	Mouse line	Genetic Background	[ToI2CagmEYFP]	[ToI2 transposase]	[CAG-RFP]	Tamoxifen	Tamoxifen stage
6f	P0	Serial sections	P0	WT	Swiss	3,2 µg/µl	1,6 µg/µl	-	-	-
6g	P7	Serial sections	P1	WT	Swiss	1,0 µg/µl	0,5 µg/µl	1,0 µg/µl	-	-
6i	P3	Serial sections	P0	WT	Swiss	3,2 µg/µl	1,6 µg/µl	-	-	-
S6	P7	Serial sections	E15	<i>Nestin-Cre/ERT2;Ai9</i>	<i>C57BL/6</i>	2,0 µg/µl	1,0 µg/µl	-	200 µg/pup	P0

Supplementary Table 2

Fig.	Test	Result (significant = P<0,05)	n unit	n	Mean	SD	SEM	Error bar	Dunn's multiple comparisons test	Result	Adjusted P Value
2a	Clonal dispersion (μm): 4 animals; Kruskal-Wallis test	*** p=0,0003	P7 clones (AP dispersion)	50	95,4	65,01	9,194	SEM	P7 AP vs. P21 AP	ns	0,9576
			P21 clones (AP dispersion)	63	126,7	114,8	14,46	SEM	P7 DV vs. P21 DV	ns	>0,9999
			P7 clones (DV dispersion)	50	230,7	205,2	29,03	SEM	P7 ML vs. P21 ML	ns	>0,9999
			P21 clones (DV dispersion)	63	264,8	279,7	35,24	SEM	P7+P21 AP vs. P7+P21 DV	***	0,0001
			P7 clones (ML dispersion)	50	120	124,1	17,55	SEM	ML	ns	>0,9999
			P21 clones (ML dispersion)	63	120,7	98,48	12,41	SEM	P7+P21 DV vs. P7+P21 ML	***	0,0002
2e	Volume of >3 cells clones (μm^3): 4 animals; Two-tailed Mann-Whitney test	ns p=0,9605	P7 clones	62	1959702	4363515	554167	SEM			
			P21 clones	75	1826509	3587585	414259	SEM			
2g	Number of disconnected elements per PrA clone: 4 animals; Two-tailed Mann- Whitney test	ns p=0,9043	P7 clones	53	2,83	1,919	0,2636	SEM			
			P21 clones	65	2,862	2,045	0,2537	SEM			
2h	% of cells in clusters within PrA clones: 4 animals; Two-tailed Mann-Whitney test	ns p=0,2747	P7 clones	53	78,67	32,45	4,457	SEM			
			P21 clones	65	73,82	31,94	3,962	SEM			
3b	PrA territory volume (μm^3): 4 animals; Two-tailed Mann-Whitney test	**** p<0,0001	P7 PrA	88	43068	16994	1812	SEM			
			P21 PrA	105	71379	25483	2487	SEM			
3c	PrA territory volume (μm^3): 4 animals; Two-tailed Mann-Whitney tests	**** p<0,0001	P7 PrA (bin 1)	11	22197	8013	2416	SEM			
			P21 PrA (bin 1)	15	40402	11490	2967	SEM			
			P7 PrA (bin 2)	14	41782	17945	4796	SEM			
			P21 PrA (bin 2)	14	84833	17357	4639	SEM			
			P7 PrA (bin 3)	12	53228	18524	5348	SEM			
			P21 PrA (bin 3)	16	86394	14118	3530	SEM			
			P7 PrA (bin 4)	18	52171	15033	3543	SEM			
			P21 PrA (bin 4)	20	68665	24243	5421	SEM			
p=0,0146	*	P7 PrA (bin 5)	22	47881	9620	2051	SEM				
		P21 PrA (bin 5)	30	81415	22621	4130	SEM				
p=0,0197	****	P7 PrA (bin 6)	11	29966	8917	2689	SEM				

		p<0,0001	P21 PrA (bin 6)	10	50308	22685	7174	SEM			
3e	Number of PrA branches: Two-tailed Mann-Whitney test	***	P7 PrA	39	813,5	687	110	SEM			
		p=0,0004	P21 PrA	33	1360	870,9	151,6	SEM			
3f	Total length of PrA branches (µm): Two-tailed Mann-Whitney test	****	P7 PrA	39	3648	1661	266,1	SEM			
		p<0,0001	P21 PrA	33	6498	3198	556,6	SEM			
3g	Volume of PrA models (µm ³): Two-tailed Mann-Whitney test	**	P7 PrA	39	2080	930,3	149	SEM			
		p=0,0014	P21 PrA	33	2900	1143	198,9	SEM			
4b	Number of cells per PrA clone: 9 animals; Kruskal-Wallis test	****	P4 clones	290	4,459	3,232	0,1898	SEM	P4 vs. P7 PrA clones	****	<0,0001
		p<0,0001	P7 clones	137	7,949	6,02	0,5143	SEM	P7 vs. P21 PrA clones	ns	>0,9999
			P21 clones	212	8,142	6,906	0,4743	SEM			
4g	% of clones per animal for each clone category: 9 animals; Kruskal-Wallis tests	**	P4 animals (PrA: % of clones)	3	77,46	8,367	4,831	SEM	P4 vs. P7 PrA	ns	>0,9999
		p=0,0024	P7 animals (PrA: % of clones)	3	70,56	2,747	1,586	SEM	P7 vs. P21 PrA	ns	>0,9999
			P21 animals (PrA: % of clones)	3	80,28	6,935	4,004	SEM	P4 vs. P7 PiA	ns	>0,9999
			P4 animals (PiA: % of clones)	3	5,176	3,618	2,089	SEM	P7 vs. P21 PiA	ns	>0,9999
			P7 animals (PiA: % of clones)	3	9,253	4,987	2,879	SEM	P4 vs. P7 Heterogeneous	ns	>0,9999
			P21 animals (PiA: % of clones)	3	1,357	1,318	0,7608	SEM	P7 vs. P21 Heterogeneous	ns	>0,9999
			P4 animals (Heterogeneous: % of clones)	3	17,37	4,903	2,831	SEM	P4 vs. P21 PrA	ns	>0,9999
			P7 animals (Heterogeneous: % of clones)	3	20,19	3,866	2,232	SEM	P4 vs. P21 PiA	ns	>0,9999
			P21 animals (Heterogeneous: % of clones)	3	18,37	6,119	3,533	SEM	P4 vs. P21 Heterogeneous	ns	>0,9999
		****	P4P7P21 animals (PrA: % of clones)	9	76,1	7,081	2,36	-	PrA vs. PiA clones	****	<0,0001
		p<0,0001	P4P7P21 animals (PiA: % of clones)	9	5,262	4,65	1,55	-	PiA vs. Heterogenous clones	ns	0,0568
			P4P7P21 animals (Heterogeneous: % of clones)	9	19,25	3,933	1,311	-	PrA vs. Heterogeneous clones	*	0,0445
4h	Number of cells per clone for each clone category: 9 animals; Kruskal-Wallis test	****	P4 PrA clones	290	4,459	3,232	0,1898	SEM	P4 PrA vs. P4 Heterogeneous clones	****	<0,0001
		p<0,0001	P4 Heterogeneous clones	69	8,841	4,451	0,5359	SEM	P7 PrA vs. P7 Heterogeneous clones	****	<0,0001
			P7 PrA clones	137	7,949	6,02	0,5143	SEM	P21 PrA vs. P21 Heterogeneous clones	****	<0,0001
			P7 Heterogeneous clones	42	13,93	6,07	0,9367	SEM			

			P21 PrA clones	212	8,142	6,906	0,4743	SEM			
			P21 Heterogeneous clones	52	13,25	6,718	0,9316	SEM			
4i	Number of cells per PrA clone in lower or upper cortical layers: 9 animals; Kruskal-Wallis test	**** p<0,0001	P4 Lower layers PrA clones	139	3,532	2,301	0,1952	SEM	P4 L vs. P4 U	***	0,0004
			P4 Upper layers PrA clones	151	5,311	3,704	0,3015	SEM	P4 L vs. P7 L	***	0,0003
			P7 Lower layers PrA clones	70	5,914	4,141	0,495	SEM	P7 L vs. P21 L	ns	>0,9999
			P7 Upper layers PrA clones	67	10,07	6,911	0,8444	SEM	P4 U vs. P7 U	****	<0,0001
			P21 Lower layers PrA clones	109	5,385	4,599	0,4405	SEM	P7 U vs. P21 U	ns	>0,9999
			P21 Upper layers PrA clones	103	11,06	7,718	0,7605	SEM	P21 L vs. P21 U	****	<0,0001
									P7 L vs. P7 U	**	0,001
5c	Relative DV dispersion (% of cortical thickness/number of cells) per PrA clone >1 cell: 6 animals; One-tailed Mann-Whitney test	* p=0,0381	P4 PrA clones	250	3,947	3,508	0,2219	SEM			
			P7 PrA clones	132	3,032	2,302	0,2004	SEM			
5d	Relative ML dispersion (dispersion/number of cells) (μm) per PrA clone >1 cell: 6 animals; Two-tailed Mann-Whitney test	*** p=0,001	P4 PrA clones	250	37,69	17,78	1,125	SEM			
			P7 PrA clones	132	31,56	15,8	1,375	SEM			
5i	Distance between EdU+ cells within MM+ PrA pairs (μm): 10 animals; Kruskal-Wallis test	**** p<0,0001	EdU+ 48hpi /MM+ P4 PrA pairs	70	37,19	24,93	2,979	SEM	48hpi P4 vs. 24hpi P4	****	<0,0001
			EdU+ 24hpi /MM+ P4 PrA pairs	176	21,6	11,82	0,8911	SEM	48hpi P7 vs. 24hpi P7	*	0,0446
			EdU+ 48hpi /MM+ P7 PrA pairs	38	24,49	13,83	2,243	SEM	48hpi P4 vs. 48hpi P7	*	0,0357
			EdU+ 24hpi /MM+ P7 PrA pairs	108	19,97	14,12	1,358	SEM	24hpi P4 vs. 24hpi P7	ns	0,1083
5k	% of PrA belonging to doublets among PrA per animal: 6 animals; Two-tailed Mann-Whitney test	ns p>0,9999	P4 animals	3	20,22	4,787	2,764	SEM			
			P7 animals	3	24,51	15,28	8,821	SEM			
5k	% of EdU+/MM+ PrA: 10 animals; Two-tailed Mann-Whitney test	ns p=0,5167	P4 animals (% of EdU+/MM+ PrA)	7	11,88	3,332	1,259	SEM			
			P7 animals (% of EdU+/MM+ PrA)	3	9,533	2,371	1,369	SEM			
	% of EdU+/MM+ PiA: 10 animals; Two-tailed Mann-Whitney test	* p=0,0167	P4 animals (% of EdU+/MM+ PiA)	7	23,04	3,863	1,46	SEM			
			P7 animals (% of EdU+/MM+ PiA)	3	8,57	0,9089	0,5247	SEM			
6b	% of S100 β +/MM+ cells: 11 animals; Two-tailed Mann-Whitney test	* p=0,0286	E18 animals	4	5,045	1,941	0,9705	SEM			
			P0 animals	4	9,493	2,253	1,127	SEM			
			(P1 animals)	3	9,241	0,6387	0,3688	SEM			
S1g	Maximal distance between one cell and	ns	Rares clones	18	200,6	140	32,99	SD			

	her neighbouring sister cells per clone (µm): 4 animals; Two-tailed Mann-Whitney test	p=0,6421	All clones	122	219,5	132,6	12,01	SD			
S2b	Mean size (µm) of Delaunay triangulation segments per clone >3 cells: 4 animals; Two-tailed Mann-Whitney test	ns	P7 clones	62	144,6	77,27	9,814	SEM			
		p=0,5447	P21 clones	75	156,3	88,26	10,19	SEM			
S3g	ConvexHull volume of PrA models (µm ³): Two-tailed Mann-Whitney test	***	P7 PrA	39	66898	24828	3976	SEM			
		p=0,0001	P21 PrA	33	90270	23176	4034	SEM			
S5c	% of PrA belonging to doublets among PrA per animal: 9 animals; Kruskal-Wallis test	ns	P4 animals	3	0,2022	0,04787	0,0276	SEM	P4 vs. P7	ns	>0,9999
		p=0,8286	P7 animals	3	0,2451	0,1528	0,0882	SEM	P7 vs. P21	ns	>0,9999
			P21 animals	3	0,1688	0,06182	0,0357	SEM			
S5e	% of MM+/Ki67+ PrA: 11 animals; Two-tailed Mann-Whitney test	**	P4 animals	6	21,98	3,872	1,581	SEM			
		p=0,0043	P7 animals	5	9,702	1,83	0,8185	SEM			
	% of MM+/Ki67+ PiA: 11 animals; Two-tailed Mann-Whitney test	**	P4 animals	6	18,04	2,404	0,9816	SEM			
		p=0,0043	P7 animals	5	6,514	3,143	1,406	SEM			
S6c	% of MM+ cells for each cell type: 7 animals; Two-tailed Mann-Whitney tests	ns	P7 animals (PrA: % of MM+ cells)	4	60,48	2,653	1,327	SEM			
		p=0,6286	P21 animals (PrA: % of MM+ cells)	3	62,76	7,053	4,072	SEM			
		ns	P7 animals (PiA: % of MM+ cells)	4	7,93	5,528	2,764	SEM			
		p=0,0571	P21 animals (PiA: % of MM+ cells)	3	1,054	0,3872	0,2236	SEM			
		ns	P7 animals (Other glial cells: % of MM+ cells)	4	23,89	5,148	2,574	SEM			
		p=0,1143	P21 animals (Other glial cells: % of MM+ cells)	3	31,99	6,335	3,658	SEM			
		ns	P7 animals (Neurons: % of MM+ cells)	4	7,703	0,5395	0,2697	SEM			
S6h	Mean cell relative position (% of cortical thickness): 5 animals; Two-tailed Mann-Whitney test	*	P7 animals (YFP+/Tomato- glial cells)	5	43,65	3,756	1,68	SEM			
		p=0,0317	P7 animals (YFP+/Tomato+ glial cells)	5	51,66	3,957	1,77	SEM			
S6g	Number of PrA (% of electroporated glial cells): 5 animals; Two-tailed Mann-Whitney test	ns	P7 animals (YFP+/Tomato- glial cells)	5	36,83	10,08	4,51	SEM			
		p=0,3095	P7 animals (YFP+/Tomato+ glial cells)	5	44,93	7,903	3,534	SEM			
	Number of PiA (% of electroporated glial cells): 5 animals; Two-tailed Mann-Whitney test	ns	P7 animals (YFP+/Tomato- glial cells)	5	10,91	4,137	1,85	SEM			
		p=0,3095	P7 animals (YFP+/Tomato+ glial cells)	5	7,33	3,863	1,727	SEM			

Article 3 (en révision)

LES CELLULES SOUCHES NEURALES ADULTES ET LES CELLULES EPENDYMAIRES MULTICILIEES PARTAGENT UN LIGNAGE COMMUN REGULE PAR LES MEMBRES LA FAMILLE DES GEMININES

Gonzalo Ortiz Alvarez^{1*}, Marie Daclin^{1*}, Asm Shihavuddin^{1,5}, Pauline Lansade¹, Aurélien Fortoul¹, Marion Faucourt¹, **Solène Clavreul**², Stavros Taraviras³, Simon Hippenmeyer⁴, Jean Livet², Alice Meunier¹, Auguste Genovesio¹ and Nathalie Spassky¹

AFFILIATIONS

¹ Cilia biology and neurogenesis, Institut de biologie de l'Ecole normale supérieure (IBENS), Ecole normale supérieure, CNRS, INSERM, PSL Université Paris 75005 Paris, France

² Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, F-75012 Paris, France

³ Department of Physiology, Medical School, University of Patras, 26504 Rio, Patras, Greece

⁴ Institute of Science and Technology Austria, Am Campus 1, 3400 Klosterneuburg, Austria

⁵ Adresse actuelle: Department of Applied Mathematics and Computer Science, Technical University of Denmark (DTU), Kgs. Lyngby, Denmark

*Contribution égale

Correspondance: nathalie.spassky@ens.fr

RESUME

Les cellules souches neurales adultes et les cellules épendymaires multiciliées sont des cellules gliales essentielles aux fonctions neurologiques. Ensemble, elles constituent la niche neurogénique adulte. Grâce à l'utilisation d'analyses clonales performantes et à la résolution cellulaire des patrons de division des progéniteurs et de leur devenir, nous montrons que ces deux composantes de la niche neurogénique sont liées linéairement: les cellules souches neurales adultes et les cellules épendymaires sont des cellules sœurs, et la plupart des cellules épendymaires de ce lignage proviennent de divisions symétriques terminales. De manière inattendue, nous avons constaté que les régulateurs antagonistes de la réplication de l'ADN, GemC1 et les géminines, peuvent ajuster la proportion de cellules souches neurales et de cellules épendymaires. Nos résultats révèlent la dynamique contrôlée de l'ontogenèse de la niche neurogénique et identifient les membres de la famille des géminines comme régulateurs clés du pool initial de cellules souches neurales adultes.

ADULT NEURAL STEM CELLS AND MULTICILIATED EPENDYMAL CELLS SHARE A COMMON LINEAGE REGULATED BY THE GEMININ FAMILY MEMBERS

Gonzalo Ortiz Alvarez^{1*}, Marie Daclin^{1*}, Asm Shihavuddin^{1,5}, Pauline Lansade¹, Aurélien Fortoul¹, Marion Faucourt¹, Solène Clavreul², Stavros Taraviras³, Simon Hippenmeyer⁴, Jean Livet², Alice Meunier¹, Auguste Genovesio¹ and Nathalie Spassky¹

AFFILIATIONS

¹Cilia biology and neurogenesis, Institut de biologie de l'Ecole normale supérieure (IBENS), Ecole normale supérieure, CNRS, INSERM, PSL Université Paris 75005 Paris, France

²Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, F-75012 Paris, France

³Department of Physiology, Medical School, University of Patras, 26504 Rio, Patras, Greece

⁴Institute of Science and Technology Austria, Am Campus 1, 3400 Klosterneuburg, Austria

⁵Present address: Department of Applied Mathematics and Computer Science, Technical University of Denmark (DTU), Kgs. Lyngby, Denmark

AUTHOR LIST FOOTNOTES

*Equal contribution

Corresponding author and lead contact e-mail address: nathalie.spassky@ens.fr

SUMMARY

Adult neural stem cells and multiciliated ependymal cells are glial cells essential for neurological functions. Together, they make up the adult neurogenic niche. Using both high throughput clonal analysis and single-cell resolution of progenitor division patterns and fate, we show that these two components of the neurogenic niche are lineally related: adult neural stem cells are sister cells to ependymal cells, while most ependymal cells arise from the terminal symmetric divisions of the lineage. Unexpectedly, we found that the antagonist regulators of DNA replication, GemC1 and Geminin can tune the proportion of neural stem cells and ependymal cells. Our findings reveal the controlled dynamic of the neurogenic niche ontogeny and identify the Geminin family members as key regulators of the initial pool of adult neural stem cells.

INTRODUCTION

Neurons and glial cells are continuously produced throughout life. In the adult, a subpopulation of astrocytes (type B1) located in the ventricular-subventricular (V-SVZ) region of the lateral ventricles (LV) retain stem cell properties, i.e., self-renewal and multilineage differentiation (Doetsch et al., 1999). These cells have a multipolar shape, contact both the LV and the blood vessels, and are surrounded by multiciliated ependymal cells (Shen et al., 2008; Tavazoie et al., 2008; Mirzadeh et al., 2008). The coordinated beating of ependymal cilia contributes to cerebrospinal fluid (CSF) dynamics, which is crucial for the exposure of type B1 cells to trophic and metabolic signals and to clear toxins and waste from the brain (Spassky and Meunier, 2017). Proper functioning of adult neurogenesis thus depends on the production and positioning of the controlled number of ependymal cells and type B1 astrocytes composing the neurogenic niche.

Type B1 astrocytes and ependymal cells are both derived from radial glial cells (RGCs) between E13.5 and E15.5 and progressively acquire identical phenotypic markers (Sox2, Sox9, Nestin, CD133) (Ferri et al., 2004; Mirzadeh et al., 2008; Sun et al., 2017). However in the adult, these cells have very different morphologies and fulfill different functions: e.g. while B1 astrocytes are reactivable quiescent neuronal progenitors, multiciliated ependymal cells are postmitotic throughout life (Fuentealba et al., 2015; Furutachi et al., 2015; Shah et al., 2018; Spassky et al., 2005). It is totally unknown how these cells are allocated to the neurogenic niche and how they acquire their common characteristics and distinct identities and functions.

Recent studies have demonstrated that GemC1 and Mcidas as early regulators of multiciliogenesis in different organs (Arbi et al., 2016; Boon et al., 2014; Kyrousi et al., 2015; Ma et al., 2014; Stubbs et al., 2012; Terré et al., 2016; Zhou et al., 2015). Interestingly, these coiled-coil proteins together with their antagonist Geminin are part of the Geminin superfamily, which was initially characterized for its role in DNA replication control (Balestrini et al., 2010; McGarry and Kirschner, 1998; Pefani et al., 2011). More recently, Geminin was found to regulate neural cell fate and to be highly expressed in cycling type B1 cells in the adult SVZ (Khatri et al., 2014; Sankar et al., 2016).

Here, we exploited high resolution lineage-tracing techniques, namely the MAGIC Markers (Loulier et al., 2014) and MADM strategies (Gao et al., 2014) in the mouse brain to show that type B1 astrocytes and ependymal cells share a common RGC progenitor. These RGCs first

produce type B1 astrocytes through both symmetric and asymmetric divisions. Ultimately, ependymal cells are produced through a terminal symmetric division. We also examined the role of antagonist regulators of DNA replication (GemC1 and Geminin) in the lineage progression. We show that GemC1 promotes premature symmetric division of RGCs producing ependymal cells at the expense of astrocytes, whereas Geminin favors symmetric divisions producing type B1 astrocytes. Altogether, we show that ependymal cells and type B1 astrocytes share a common lineage, in which type B1 cells are produced first followed by a majority of ependymal cells. This dynamic can be modulated by the Geminin family members.

RESULTS

1) Ependymal cells originate from locally-differentiated RGCs

Multiciliated ependymal cells are generated from RGCs around E15 ([Spassky et al., 2005](#)). To determine how these cells develop, we performed a single injection of EdU at E15.5 and studied the relative positions of EdU⁺ ependymal cells on the ventricular walls at P15. EdU⁺ ependymal cells were often juxtaposed or close to each other ([Supplementary Figure 1A-B](#)). To quantitatively assess their spatial distribution, we performed a nearest-neighbor distance (NND) analysis on the data sets. The NNDs among EdU⁺ ependymal cells were significantly shorter than in simulated random data sets, suggesting that ependymal cells born at the same time remain in the same area ([Supplementary Figure 1C](#)). To further test this possibility, we employed a genetic fate-tracing strategy. We crossed the Ai14 transgenic mouse line, which expresses tdTomato after Cre-dependent excision of a “floxed-stop” cassette ([Madisen et al., 2010](#)), with Emx1-Cre, Gsh2-Cre or Nkx2.1-Cre transgenic mice, which mainly express Cre in the dorsal/medial, lateral and ventral regions of the lateral ventricles, respectively ([Figure 1A-C](#)). At P10, almost all ependymal cells were tdT⁺ in Cre-expressing ventricular walls ([Figure 1D-F](#)), whereas they were tdT⁻ in Cre negative regions ([Figure 1G-I](#)), showing that ependymal cells do not migrate out of their site of origin during maturation ([Figure 1J-M](#)). We observed similar results in all caudo-rostral regions examined. Together, these results show that ependymal cells are produced locally and do not migrate long distances from their site of origin.

2) *In utero* electroporation (IUE) labels ependymal cells and type B1 astrocytes in the V-SVZ

Given that ependymal cells develop locally from RGCs, we labeled their progenitors at E14.5 in the Lateral Ganglionic Eminence (LGE) by electroporation *in utero* and traced their lineage at later stages. We first verified that cells targeted by IUE are cycling by injecting EdU at E13.5 or E14.5. The next day, $78\pm 2\%$ of electroporated cells were indeed EdU⁺ (Supplementary Figure 2), confirming that cycling cells are preferentially transfected by IUE and that progenitor fate can be traced by this technique, as previously shown (Loulier et al., 2014; Stancik et al., 2010).

We then characterized the progeny of cells electroporated at E14.5 with the H2B-GFP plasmid by immunostaining the V-SVZ at P10-P15 with FoxJ1 and Sox9 antibodies to distinguish ependymal cells (FoxJ1⁺Sox9⁺) from other glial cells (FoxJ1⁻Sox9⁺) (Sun et al., 2017) (Figure 2A-B). We observed that around two thirds of GFP⁺ cells were ependymal cells, whereas most of the remaining FoxJ1⁻ cells were Sox9⁺ astrocytes (Figure 2C). We also performed FOP and GFAP staining to distinguish ependymal cells (multiple FOP⁺ basal bodies/GFAP⁻) from astrocytes (FOP⁺ centrosome/GFAP⁺). Most electroporated cells close to the ventricular surface were either GFAP⁻ ependymal cells containing multiple FOP⁺ basal bodies or GFAP⁺ astrocytes with one FOP⁺ centrosome (Figure 2D). A ventricular contact emitting a primary cilium was also observed on GFP⁺ astrocytes (Doetsch et al., 1999). The GFP⁺ astrocytes often had an unusual nuclear morphology with envelope invaginations, as recently reported (Cebrián-Silla et al., 2017). Noteworthy, neuroblasts with their typical migratory morphology were observed deeper in the tissue and at a distance from the electroporated area in the direction of the olfactory bulb (data not shown).

To further test whether some of the astrocytes originating from the electroporated RGCs could act as adult neural stem cells (type B1 astrocytes), we permanently labeled RGCs and their progeny with a transposable *Nucbow* vector at E14.5 (nuclear MAGIC markers, Loulier et al., 2014) and administered EdU through the animals' drinking water for 14 days starting at P21 (Figure 2E). One week after the end of EdU administration, EdU⁺Nucbow⁺ neurons were observed on each olfactory bulb section, showing that cells derived from electroporated RGCs at E14.5 are adult neural stem cells that give rise to olfactory bulb neurons (Figure 2F-G).

These results show that electroporation of RGCs at E14.5 labels multiciliated ependymal cells and adult neural stem cells (type B1 astrocytes) that are retained in the V-SVZ at adult stages.

3) Lineage-tracing using MAGIC Markers show that ependymal cells derive from symmetric and asymmetric divisions of RGCs

We then took advantage of the large panel of distinct colors produced by the MAGIC Markers approach to trace and analyze the lineage of ependymal cells. The V-SVZ of P15-P20 brains electroporated with the Nucbow vector at E14.5 were immunostained with the ependymal marker FoxJ1 in far red, and colors were automatically analyzed to avoid any eye bias (Figure 3A-C). Briefly, FoxJ1 staining was first used as a reference for the ventricular surface and 25 μ m-thick 3D image stacks of the ventricular whole-mounts were segmented as previously described (Shihavuddin et al., 2017). Nucbow⁺ cells were then sorted as FoxJ1⁺ or FoxJ1⁻ (Supplementary Figure 3, Figure 3D). To define the criteria for sister cells, 2 independent researchers manually picked 49 pairs of cells with similar Nucbow colors (Supplementary Figure 4A). Both their color content (saturation, value and hue in the RGB tridimensional space) and their 3D spatial distances were computed (Supplementary Figure 4B-C). The maximum difference found for each of these parameters was chosen as a threshold for the automatic analysis of all Nucbow⁺ cells in each brain (Figure 3E, Supplementary Figure 4D-G). This automatic analysis of all cells from 6 electroporated brains (a total of 7668 Nucbow⁺ cells were analyzed and 418 clones of more than 2 cells) showed that 80% of clones (with at least one Nucbow⁺FoxJ1⁺ cell) contained 6 or less cells, suggesting that most ependymal cells were derived from 3 or less cell divisions (Figure 3F-G, Supplementary Figure 5A-F). We excluded the largest clones (7 to 32 cells) as we noted that they were often labeled with the most frequent labels in the dataset (corresponding to primary colors red, green, blue), suggesting that merging of juxtaposed clones expressing the same label had occurred (Supplementary Figure 5G).

Among the 323 clones with fewer than 6 cells, around half contained only 2 cells, suggesting that, at E14.5, most clones were generated from one terminal cell division of RGCs (n=6 mice, Figure 3H). These 2-cell clones were composed of 1 or 2 FoxJ1⁺ cells, showing that the terminal division could be either symmetric or asymmetric (Figure 3I). Interestingly, the 3D distance between cells was higher in mixed clones (clones composed of ependymal and non-ependymal cells) compared to pure ependymal clones (Figure 3J), showing that FoxJ1⁻ cells were deeper in the SVZ compared to FoxJ1⁺ cells in the VZ.

Clones containing 3 to 6 cells were generated through 2 or 3 cell divisions, the last of which was either only symmetric (clones containing FoxJ1⁺ cells only), or both symmetric and asymmetric (clones containing FoxJ1⁺ and FoxJ1⁻ cells). Interestingly, a majority of these clones contained more FoxJ1⁻ cells than FoxJ1⁺ cells suggesting that symmetric divisions giving rise to 2 FoxJ1⁻ cells might have occurred in these clones (Figure 3K).

Lineage-tracing experiments of RGCs using the MAGIC Markers strategy thus show that ependymal cells originate from either one terminal symmetric division giving rise to 2 ependymal cells, or 1 asymmetric division giving rise to 1 ependymal and 1 FoxJ1⁻ cell. Most importantly, this analysis of a large number of clones along the walls of the LV revealed no evidence of regional differences. This observation suggests that the ontogeny of the neurogenic niche can be determined by analyzing individual cells along the LV.

4) Mosaic Analysis with Double Markers (MADM) of V-SVZ gliogenesis reveals that E and B1 cells share a common lineage

To obtain more insight into the cellular mechanisms and the sequence of symmetric versus asymmetric divisions producing each clone, we used the MADM system coupled with IUE of Cre recombinase at E13.5 or E14.5 (Figure 4A; Gao et al., 2014). In electroporated cells, Cre recombinase mediates interchromosomal recombination, which reconstitutes cytoplasmic enhanced GFP (EGFP, green) or tandem-dimer Tomato (tdTomato, red). If recombination occurs in the G2 phase of the cell cycle, and each red or green chromosome segregates in each daughter cell (X segregation), the two descendent lineages will be permanently labelled in green or red by MADM events (Figure 4B). Analysis of cell number and identity will thus allow direct assessment of the division pattern (symmetric versus asymmetric) and cell fate decision of the original dividing progenitors. Otherwise, if recombination occurs in G0/G1, or if both red and green chromosomes segregate in the same cell (Z segregation), recombined cells appear yellow and will be excluded from the analysis (Figure 4B). We thus induced Cre activity through IUE in MADM pregnant mothers at E13.5 or E14.5 and analyzed V-SVZ at P15-P20 after immunolabelling of centrioles combined with MADM cytoplasmic staining to identify the cell types composing each clone (Figure 4C). This approach allowed a clonal study of green-red clones because the efficiency of recombination was low in these mice (mean number of clones per animal=5) and most recombined cells were double-labeled (yellow) (Figure 4C).

Cells were considered a clone if their spatial distance was less than 100 μm , as previously defined by the Nucbow lineage-tracing experiments. Red or green cells located in the electroporated region of the V-SVZ were either multiciliated ependymal cells (E) characterized by a few short processes and multiple FOP⁺ basal bodies in their cytoplasm associated with long cilia, or astrocytes (type B1) the cell body of which and multiple long processes were deeper in the SVZ. These astrocytes contained a centrosome that occasionally contacted the ventricular surface. When the cells of a clone were in close proximity, their cell body or processes often contacted each other, suggesting that they might maintain communication at adult stage (Figure 4C-G; Supplementary movies 1 and 2). We observed very few red or green cells alone (clone of 1 cell in Figure 4H) or larger monochrome clones, if any, in the V-SVZ, suggesting that asymmetric divisions giving rise to one ventricular and one non-ventricular cell were rare in these experiments. In contrast, the majority of red-green clones contained two cells when Cre was electroporated at E14.5, which is in line with our findings above showing that most RGCs divided once to produce glial cells in the V-SVZ. At E13.5, RGCs also produced V-SVZ cells, but the majority divided twice since most clones contained 3 to 4 cells (Figure 4H). The distance between the cells in a clone was higher at E13.5 compared to E14.5, showing that cells disperse as cell divisions proceed (Figure 4I). Both the proportion of mixed clones (containing both E and B1 cells; Figure 4J) and the number of type B1 astrocytes (Figure 4K) in the clones decreased at E14.5 compared to E13.5, suggesting that fewer type B1 astrocytes are produced compared to ependymal cells. Alternatively, type B1 astrocytes might be produced at earlier stages compared to ependymal cells. Noteworthy, the distribution of astrocytes (B1) and ependymal cells (E) in each clone revealed that astrocytes were produced at a lower rate than ependymal cells and that symmetric divisions producing 2 astrocytes (B1-B1) occurred more frequently at E13.5 than at E14.5 (Figure 4L; Supplementary Table 1).

Together, these results show that ependymal cells and astrocytes are sister cells produced through symmetric (B1-B1 or E-E) and asymmetric (E-B1) divisions of RGCs at mid-gestation in the mouse forebrain. To gain more insight into the molecular regulation of RGC differentiation into type B1 astrocytes or ependymal cells, we perturbed these divisions with members of the Geminin superfamily, initially described as regulators of DNA replication (Balestrini et al., 2010; Pefani et al., 2011). Two members of this family (Mcidas and GemC1) were recently identified as master regulators of multiciliated ependymal cell fate (Kyrousi et al., 2015), while the other member Geminin was not yet studied.

5) GemC1 expression induces premature ependymal cell differentiation at the expense of type B1 cells.

Overexpression of GemC1 through IUE at E13.5 (data not shown) or E14.5 dramatically increased ependymal cell differentiation at the expense of SVZ cells, as previously shown ([Supplementary Figure 6A-D](#); [Kyrrousi et al., 2015](#)). Interestingly, since B1 cells were absent, pinwheels were not observed in densely GemC1-electroporated regions ([Supplementary Figure 6E-F](#)) compared to neighboring areas in which GemC1 electroporation was sparse ([Supplementary Figure 6G](#)). Overexpression of GemC1 together with the induction of Cre activity through IUE in MADM embryos at E14.5 did not change the size of the clones compared to controls, suggesting that most RGC were already undergoing their last division at that stage (Chi² test for trend between E14.5 and E14.5GemC1: not significant $p>0.1$; compare [Figure 4H and 5C](#)). In contrast, when IUE was performed at E13.5, the clones were smaller compared to controls suggesting that GemC1 induced premature exit from the cell cycle at that stage (Chi² test for trend between E13.5 and E13.5GemC1: $**p\leq 0.01$; compare [Figure 4H and 5C](#)). Consistently, the average distance between cells in the GemC1 clones at E13.5 was smaller than in controls (compare [Figure 4I and 5D](#), Mann-Whitney test; $**p\leq 0.01$) and similar to E14.5GemC1 ([Figure 5D](#)). Furthermore, overexpression of GemC1 at E13.5 or E14.5 promoted the ependymal fate, since the numbers of both pure ependymal clones and ependymal cells in the clones were dramatically increased compared to controls (two-proportion Z-test between controls and GemC1: $***p\leq 0.001$; compare [Figures 4J-K and 5E-F](#)). Notably, although astrocytes were occasionally produced through symmetric divisions in controls, they were exclusively generated through asymmetric divisions of ependymal cells after GemC1 overexpression at E13.5 or E14.5. Indeed, no pairs of astrocytes were detected after GemC1 overexpression ([Figure 6F](#); [Supplementary Table 2](#)).

6) Geminin expression favors the generation of type B1 cells

Geminin physically interacts with GemC1 and Mcidas ([Caillat et al., 2013, 2015](#)), but its role during ependymal cell generation is still unknown. We thus tested the influence of Geminin overexpression on the fate of RGCs through IUE with Cre in MADM pregnant mothers at E14.5

(Figure 6A-B). Notably, a majority of the clones contained type B1 astrocytes characterized by an apical contact with a primary cilium and cytoplasmic extensions contacting blood vessels (Figure 6B; Supplementary movie 3; Supplementary Table 3). The size of the clones was similar to that of controls, suggesting that Geminin does not act on the rate of cell division in RGCs (Chi² test for trend between E14.5 and E14.5Geminin: not significant, $p > 0.1$; compare Figure 4H and 6C). Interestingly, the proportion of mixed clones and the number of type B1 astrocytes were not significantly increased after Geminin overexpression (two-proportion Z-test between controls and Geminin: not significant $p > 0.1$; compare Figures 4J-K and 6D-E; Figure 6F). However, Geminin overexpression at E14.5 led to the formation of clones containing only B1 cells, which was never observed in controls (Figure 6D). Consistently, the number of symmetric divisions producing 2 astrocytes (B1-B1) increased significantly after Geminin overexpression at E14.5 compared to controls (Figure 6F; Supplementary Table 3). Altogether, these results show that ependymal cells and astrocytes are sister cells produced through symmetric or asymmetric divisions, the balance of which is modulated by the level of expression of Geminin family genes.

DISCUSSION

By using a Cre-lox fate mapping technique and complementary MAGIC Markers- and MADM-based clonal analysis approaches, our study reveals how glial cells are produced in the V-SVZ during development. First, our results proved that ependymal cells are derived from RGCs all along the embryonic neuroepithelium (pallium, Lateral and Medial Ganglionic Eminences) and differentiate locally, this is, ependymal progenitors born in a specific area of the VZ do not migrate long distances to colonize other areas of the neuroepithelium (Figure 1). We then show that ependymal cells and B1 type astrocytes appear at the end of neurogenesis mainly through E-B1 asymmetric or E-E symmetric divisions of RGCs. B1-B1 symmetric divisions were less frequent and always combined with E-E or E-B1 divisions (Figure 7). These glial cells have a low migratory capacity and often contact each other, even at the adult stage. Our study thus demonstrates that multiciliated ependymal cells and adult neural stem cells, ultimately forming the adult neurogenic niche, are sister cells that share a common origin. We also provide evidence that these cells are sequentially produced, with the bulk of B1 astrocytes being produced just before the bulk of ependymal cells. Interestingly, their respective numbers are precisely regulated by the Geminin-family members. Geminin overexpression, a

gene whose expression is higher in cycling B1 cells (Khatri et al., 2014), favors B1-B1 symmetric divisions and increases the final total number of these cells (Figure 6D-E). On the contrary, overexpression of its antagonist, GemC1, leads to more terminal E-E divisions, as well as an increase in the final number of ependymal cells (Figure 5E-F). One could thus hypothesize that the sequential expression of Geminin family members could be responsible for the temporal differences in glia production, and that the defined proportions of E and B1 cells (with a two-fold presence of E cells with respect to B1 cells, Mirzadeh et al., 2008) could be established by the balance of these genes. These findings raise the question of the fate-decision mechanisms driving RGCs towards symmetric or asymmetric cell division. An analogous question was addressed by others concerning neural versus glial cell generation. Interestingly, it was shown that the number of neurons produced by RG is predictable, suggesting that RGCs can perform a gliogenic division only when they have exhausted their capacity to proliferate (Gao et al., 2014). Similarly, we found that RGCs generate more mixed clones and more astrocytes when they are electroporated at E13.5 than at E14.5 (Figure 4J-K). This supports the hypothesis that astrocytes are produced earlier than ependymal cells. One might hypothesize that RGCs first give rise to astrocytes until they exhaust their proliferative capacity and yield two ependymal cells through symmetric cell division at later developmental stages. Importantly, while ependymal cells become post-mitotic (Spassky et al., 2005), most V-SVZ astrocytes can be reactivated in the adult (Obernier et al., 2018). Altogether, this suggests that RGCs first produce quiescent daughter cells with the potential to enter the cell cycle again (type B1 astrocytes), then post-mitotic ependymal cells. Interestingly, the description of distinct pathways of glial production via symmetric or asymmetric division unveils the existence of two separate fate decision-making mechanisms, which occur subsequently to the last division of RGCs. This indicates that ependymal versus astrocyte specification might be dependent on the correct segregation of organelles (i.e. centrioles or mitochondria), which have been shown to influence neural stem cell self-renewal and fate decisions (Khacho et al., 2016; Wang et al., 2009). Noteworthy, Geminin superfamily members were initially described as regulators of DNA replication. It would thus be of interest to determine whether fate decisions in RGCs are driven by DNA replication events following re-entry into the cell cycle.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all members of the Spassky laboratory for comments and discussion. We thank X. Morin for the pCAAGS-H2B-GFP and pCAGGS-Cre plasmids. We thank A.-K. Konate and R. Nagalingum for administrative support and the IBENS Animal Facility for animal care. We thank the IBENS Imaging Facility, with grants from Region Ile-de-France (NERF 2011-45), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) (DGE 20111123023), and Fédération pour la Recherche sur le Cerveau Rotary International France (2011). The IBENS Imaging Facility and the team received support from Agence Nationale de la Recherche (ANR) Investissements d’Avenir (ANR-10-LABX-54 MEMO LIFE, ANR-11-IDEX-0001-02 PSL* Research University). The Spassky laboratory is supported by INSERM, CNRS, École Normale Supérieure (ENS), ANR (ANR-17-CE12-0021-03), European Research Council (ERC Consolidator grant 647466), Cancéropôle Ile-de-France (2014-1-PL BIO-11-INSERM 121). The Livet and Hippenmeyer laboratories are supported by European Research Council (ERC Consolidator grants 649117 and 725780, respectively). G.O.A. and M.D. received fellowships from the Labex MEMOLIFE and the French Ministry of Higher Education and Research, respectively.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

N.S. designed, funded and supervised the research. G.O.A., M.D., P.L., A.F., M.F., S.C., J.L. and N.S. designed experiments and performed the research. G.O.A., M.D., P.L., A.F., A.S., A.M., A.G. and N.S. analyzed the data. S.T., S.H. provided resources. G.O.A., M.D. and N.S. wrote the manuscript with inputs from all authors.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing financial interests

REFERENCES

- Arbi, M., Pefani, D., Kyrousi, C., Lalioti, M., Kalogeropoulou, A., Papanastasiou, A.D., Taraviras, S., and Lygerou, Z. (2016). GemC1 controls multiciliogenesis in the airway epithelium. *EMBO Rep.* *17*, 400–413.
- Balestrini, A., Cosentino, C., Errico, A., Garner, E., and Costanzo, V. (2010). GEMC1 is a TopBP1-interacting protein required for chromosomal DNA replication. *Nat. Cell Biol.* *12*, 484–491.
- Boon, M., Wallmeier, J., Ma, L., Loges, N.T., Jaspers, M., Olbrich, H., Dougherty, G.W., Raidt, J., Werner, C., Amirav, I., et al. (2014). MCIDAS mutations result in a mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nat. Commun.* *5*, 4418.

- Caillat, C., Pefani, D.-E., Gillespie, P.J., Taraviras, S., Blow, J.J., Lygerou, Z., and Perrakis, A. (2013). The Geminin and Idas Coiled Coils Preferentially Form a Heterodimer That Inhibits Geminin Function in DNA Replication Licensing. *J. Biol. Chem.* *288*, 31624–31634.
- Caillat, C., Fish, A., Pefani, D.-E., Taraviras, S., Lygerou, Z., and Perrakis, A. (2015). The structure of the GemC1 coiled coil and its interaction with the Geminin family of coiled-coil proteins. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* *71*, 2278–2286.
- Cebrián-Silla, A., Alfaro-Cervelló, C., Herranz-Pérez, V., Kaneko, N., Park, D.H., Sawamoto, K., Alvarez-Buylla, A., Lim, D.A., and García-Verdugo, J.M. (2017). Unique Organization of the Nuclear Envelope in the Post-natal Quiescent Neural Stem Cells. *Stem Cell Reports* *9*, 203–216.
- Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. *Cell* *97*, 703–716.
- Ferri, A.L., Cavallaro, M., Braidà, D., Di Cristofano, A., Canta, A., Vezzani, A., Ottolenghi, S., Pandolfi, P.P., Sala, M., DeBiasi, S., et al. (2004). Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* *131*, 3805–3819.
- Fuentealba, L.C., Rompani, S.B., Parraguez, J.I., Obernier, K., Romero, R., Cepko, C.L., and Alvarez-Buylla, A. (2015). Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell* *161*, 1644–1655.
- Furutachi, S., Miya, H., Watanabe, T., Kawai, H., Yamasaki, N., Harada, Y., Imayoshi, I., Nelson, M., Nakayama, K.I., Hirabayashi, Y., et al. (2015). Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells. *Nat. Neurosci.* *18*, 657–665.
- Gao, P., Postiglione, M.P., Krieger, T.G., Hernandez, L., Wang, C., Han, Z., Streicher, C., Papusheva, E., Insolera, R., Chugh, K., et al. (2014). Deterministic progenitor behavior and unitary production of neurons in the neocortex. *Cell* *159*, 775–788.
- Gorski, J.A., Talley, T., Qiu, M., Puellas, L., Rubenstein, J.L.R., and Jones, K.R. (2002). Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *J. Neurosci.* *22*, 6309–6314.
- Hadjantonakis, A.-K., and Papaioannou, V.E. (2004). Dynamic in vivo imaging and cell tracking using a histone fluorescent protein fusion in mice. *BMC Biotechnol.* *4*, 33.
- Hippenmeyer, S., Youn, Y.H., Moon, H.M., Miyamichi, K., Zong, H., Wynshaw-Boris, A., and Luo, L. (2010). Genetic Mosaic Dissection of Lis1 and Ndel1 in Neuronal Migration. *Neuron* *68*, 695–709.
- Kessarlis, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M., and Richardson, W.D. (2006). Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat. Neurosci.* *9*, 173–179.
- Khacho, M., Clark, A., Svoboda, D.S., Azzi, J., MacLaurin, J.G., Meghaizel, C., Sesaki, H., Lagace, D.C., Germain, M., Harper, M.E., et al. (2016). Mitochondrial Dynamics Impacts Stem Cell Identity and Fate Decisions by Regulating a Nuclear Transcriptional Program. *Cell Stem Cell* *19*, 232–247.
- Khatri, P., Obernier, K., Simeonova, I.K., Hellwig, A., Hölzl-Wenig, G., Mandl, C., Scholl, C., Wölfl, S., Winkler, J., Gaspar, J.A., et al. (2014). Proliferation and cilia dynamics in neural

stem cells prospectively isolated from the SEZ. *Sci. Rep.* **4**, 3803.

Kyrousi, C., Arbi, M., Pilz, G.-A., Pefani, D.-E., Lalioti, M.-E., Ninkovic, J., Götz, M., Lygerou, Z., and Taraviras, S. (2015). *Mcidas* and *GemC1/Lynkeas* are key regulators for the generation of multiciliated ependymal cells in the adult neurogenic niche. *Development*.

Loulier, K., Barry, R., Mahou, P., Le Franc, Y., Supatto, W., Matho, K.S., Ieng, S., Fouquet, S., Dupin, E., Benosman, R., et al. (2014). Multiplex cell and lineage tracking with combinatorial labels. *Neuron* **81**, 505–520.

Ma, L., Quigley, I., Omran, H., and Kintner, C. (2014). Multicilin drives centriole biogenesis via E2f proteins. *Genes Dev* **28**, 1461–1471.

Madisen, L., Zwingman, T.A., Sunkin, S.M., Oh, S.W., Zariwala, H.A., Gu, H., Ng, L.L., Palmiter, R.D., Hawrylycz, M.J., Jones, A.R., et al. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat. Neurosci.* **13**, 133–140.

McGarry, T.J., and Kirschner, M.W. (1998). Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell* **93**, 1043–1053.

Mirzadeh, Z., Merkle, F.T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2008). Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* **3**, 265–278.

Mirzadeh, Z., Doetsch, F., Sawamoto, K., Wichterle, H., and Alvarez-Buylla, A. (2010). The subventricular zone en-face: wholemount staining and ependymal flow. *J. Vis. Exp.*

Morin, X., Jaouen, F., and Durbec, P. (2007). Control of planar divisions by the G-protein regulator LGN maintains progenitors in the chick neuroepithelium. *Nat. Neurosci.* **10**, 1440–1448.

Obernier, K., Cebrian-Silla, A., Thomson, M., Parraguez, J.I., Anderson, R., Guinto, C., Rodas Rodriguez, J., Garcia-Verdugo, J.-M., and Alvarez-Buylla, A. (2018). Adult Neurogenesis Is Sustained by Symmetric Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell* **22**, 221–234.e8.

Ollion, J., Cochenec, J., Loll, F., Escudé, C., and Boudier, T. (2013). TANGO: a generic tool for high-throughput 3D image analysis for studying nuclear organization. *Bioinformatics* **29**, 1840–1841.

Pefani, D.-E., Dimaki, M., Spella, M., Karantzelis, N., Mitsiki, E., Kyrousi, C., Symeonidou, I.-E., Perrakis, A., Taraviras, S., and Lygerou, Z. (2011). *Idas*, a Novel Phylogenetically Conserved Geminin-related Protein, Binds to Geminin and Is Required for Cell Cycle Progression. *J. Biol. Chem.* **286**, 23234–23246.

Sage, D., Neumann, F.R., Hediger, F., Gasser, S.M., and Unser, M. (2005). Automatic tracking of individual fluorescence particles: application to the study of chromosome dynamics. *IEEE Trans. Image Process.* **14**, 1372–1383.

Sankar, S., Yellajoshyula, D., Zhang, B., Teets, B., Rockweiler, N., and Kroll, K.L. (2016). Gene regulatory networks in neural cell fate acquisition from genome-wide chromatin association of Geminin and *Zic1*. *Sci. Rep.* **6**, 37412.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682.

- Shah, P.T., Stratton, J.A., Stykel, M.G., Abbasi, S., Sharma, S., Mayr, K.A., Koblinger, K., Whelan, P.J., and Biernaskie, J. (2018). Single-Cell Transcriptomics and Fate Mapping of Ependymal Cells Reveals an Absence of Neural Stem Cell Function. *Cell* 173, 1045–1057.e9.
- Shen, Q., Wang, Y., Kokovay, E., Lin, G., Chuang, S.-M., Goderie, S.K., Roysam, B., and Temple, S. (2008). Adult SVZ Stem Cells Lie in a Vascular Niche: A Quantitative Analysis of Niche Cell-Cell Interactions. *Cell Stem Cell* 3, 289–300.
- Shihavuddin, A., Basu, S., Rexhepaj, E., Delestro, F., Menezes, N., Sigoillot, S.M., Del Nery, E., Selimi, F., Spassky, N., and Genovesio, A. (2017). Smooth 2D manifold extraction from 3D image stack. *Nat. Commun.* 8, 15554.
- Smith, A.R., Ray, A., Smith, and Ray, A. (1978). Color gamut transform pairs. *ACM SIGGRAPH Comput. Graph.* 12, 12–19.
- Spassky, N., and Meunier, A. (2017). The development and functions of multiciliated epithelia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 423–436.
- Spassky, N., Merkle, F.T., Flames, N., Tramontin, A.D., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2005). Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J. Neurosci.* 25, 10–18.
- Stancik, E.K., Navarro-Quiroga, I., Sellke, R., and Haydar, T.F. (2010). Heterogeneity in ventricular zone neural precursors contributes to neuronal fate diversity in the postnatal neocortex. *J. Neurosci.* 30, 7028–7036.
- Stubbs, J.L., Vladoar, E.K., Axelrod, J.D., and Kintner, C. (2012). Multicilin promotes centriole assembly and ciliogenesis during multiciliate cell differentiation. *Nat. Cell Biol.* 14, 140–147.
- Sun, W., Cornwell, A., Li, J., Peng, S., Osorio, M.J., Aalling, N., Wang, S., Benraiss, A., Lou, N., Goldman, S.A., et al. (2017). SOX9 Is an Astrocyte-Specific Nuclear Marker in the Adult Brain Outside the Neurogenic Regions. *J. Neurosci.* 37, 4493–4507.
- Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, B., Garcia-Verdugo, J.M., and Doetsch, F. (2008). A Specialized Vascular Niche for Adult Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell* 3, 279–288.
- Terré, B., Piergiovanni, G., Segura-Bayona, S., Gil-Gómez, G., Youssef, S.A., Attolini, C.S., Wilsch-Bräuninger, M., Jung, C., Rojas, A.M., Marjanović, M., et al. (2016). GEMC1 is a critical regulator of multiciliated cell differentiation. *EMBO J.* 35, 942–960.
- Wang, X., Tsai, J.-W., Imai, J.H., Lian, W.-N., Vallee, R.B., and Shi, S.-H. (2009). Asymmetric centrosome inheritance maintains neural progenitors in the neocortex. *Nature* 461, 947–955.
- Xu, Q., Tam, M., and Anderson, S.A. (2008). Fate mapping Nkx2.1-lineage cells in the mouse telencephalon. *J. Comp. Neurol.* 506, 16–29.
- Zhou, F., Narasimhan, V., Shboul, M., Chong, Y.L., Reversade, B., and Roy, S. (2015). Gmnc Is a Master Regulator of the Multiciliated Cell Differentiation Program. *Curr. Biol.* 25, 3267–3273.

FIGURE TITLES AND LEGENDS:

Figure 1. Ependymal cell progenitors are produced locally along the brain ventricles.

(A-C) Representative images of coronal sections of Emx1-Cre; Ai14 (A), Gsh2-Cre; Ai14 (B) and Nkx2.1-Cre; Ai14 (C) forebrain at P10, immunostained with the CD24 (green) and DsRed (tdT, red) antibodies. CD24⁺tdT⁺ ependymal cells are only observed in the Cre-expressing domains in each mouse line (indicated by a dashed line). (D-I) Representative high magnification images of the Emx1-Cre; Ai14 (D, G), Gsh2-Cre; Ai14 (E, H) and Nkx2.1-Cre; Ai14 (F, I) coronal sections immunostained with FoxJ1 (green) and DsRed (tdT, red) antibodies in the Cre⁺ domains (D, E, F) or Cre⁻ domains (G, H, I), respectively. In the Cre⁺ domains, almost all ependymal cells are tdT⁺, whereas very few cells are double-labeled in the Cre⁻ domains in each mouse line. (J-L) Quantification of tdT⁺ ependymal cells in different areas of the ventricular zone from n=4 mice from each of the three transgenic mouse lines. Error bars indicate the SEM. p-values were determined with the Mann-Whitney test; ** = p≤0.01 and *** = p≤0.001. (M) Schematic of the expression patterns of each transcription factor in the mouse forebrain at E12 and model of the spatial origin of ependymal cells at P10. D, dorsal; M, medial. The scale bar represents 200 μm (A-C) and 10 μm (D-I).

Figure 2: Radial Glial Cells generate ependymal cells and adult neural stem cells (type B1 astrocytes)

(A) Experimental schema for (B-D): the H2B-GFP-expressing plasmid was electroporated *in utero* at E14.5 and analyzed on SVZ WM at P15. CC, corpus callosum; Cx, Cortex; LV, lateral ventricle; R, Rostral and D, Dorsal. (B, D) P15 V-SVZ wholemounts were double immunostained with FoxJ1 (red) and Sox9 (blue) antibodies (B) or FOP (white) and GFAP (red) antibodies (D). (B) GFP⁺FoxJ1⁺Sox9⁺ ependymal cells are indicated by arrows and GFP⁺FoxJ1⁻Sox9⁺ astrocytes are outlined in white. (D) GFP⁺GFAP⁻ ependymal cells with multiple FOP⁺ dots are indicated by arrows and a GFP⁺GFAP⁺ astrocyte with a FOP⁺ centrosome is indicated by an arrowhead. (C) Percentage of astrocytes (Sox9⁺FoxJ1⁻), ependymal cells (Sox9⁺FoxJ1⁺) and others (Sox9⁻FoxJ1⁻) among H2B-GFP⁺ electroporated cells. Analyses were done on n=3 animals; a total of 441 cells were counted. Error bars represent the SEM. p-values were determined with the two-proportion Z-test; ***p≤0.001, **p≤0.01. (E) Experimental schema for (F-G): Nucbow plasmids (^{PB}CAG-Nucbow along with the PiggyBac transposase and the self-excising Cre recombinase) were electroporated *in utero* at E14.5 and

received EdU (through drinking water) for 14 days starting at P21. (F, G) Coronal sections of the olfactory bulb (OB) were prepared 1 week after the last day of EdU administration. (G) High magnification image of (F) to show that some Nucbow⁺ interneurons in the OB are EdU⁺. The scale bar represents 40 μm (B), 15 μm (C), 520 μm (F) and 180 μm (G).

Figure 3: Clonal analysis of ependymal cell with MAGIC Markers reveals both symmetric and asymmetric divisions of RGCs

(A) Experimental schema: Nucbow plasmids were electroporated *in utero* at E14.5 and analyzed at P15-20. (B-D) Representative Z-projected image of an *en-face* view of the V-SVZ (B) immunostained at P15 with anti-FoxJ1 antibody (C). (D) Segmented image of (B-C) obtained using FoxJ1 staining as reference (see methods and [Supplementary Figures 3-5](#)). FoxJ1⁺Nucbow⁺ cells are outlined in white. (E) Circular Hue-Saturation and Hue-Value plots of all Nucbow⁺ cells from (D). (F-G) High magnification images of the insets in (D) showing examples of clones: 2 ependymal doublets and 1 triplet containing 1 ependymal cell and 2 FoxJ1⁻ cells (F) and 3 ependymal doublets, 1 ependymal triplet and 1 triplet containing 1 ependymal cell and 2 FoxJ1⁻ cells (G). (H) Percentages of clones containing 2 or 3-6 Nucbow⁺ cells. Error bars represent the SEM of n= 163 clones of 2 cells and n=160 clones of 3-6 cells; p-values were determined by the Mann-Whitney test; ns, p>0.05. (I) Percentages of clones of 2 Nucbow⁺ cells containing 1 (mixed clones, in grey) or 2 (ependymal clones, in black) FoxJ1⁺ cells. Error bars represent the SEM of n=82 ependymal clones and n=81 mixed clones from 6 independent experiments; p-values were determined by the Mann-Whitney test; ns, p>0.05. (J) 3D distances between the cells composing ependymal or mixed clones of 2 cells. Error bars represent the SEM of n=82 ependymal clones and n=81 mixed clones from 6 independent experiments; p-values were determined by the Mann-Whitney test; *p \leq 0.05. (K) Percentages of clones of 3-6 Nucbow⁺ cells containing only FoxJ1⁺ cells (black), more or equal number of FoxJ1⁺ compared to FoxJ1⁻ cells (dark grey) or more FoxJ1⁻ cells (light grey) per clone. Error bars represent the SEM of n=160 clones of 3-6 cells; p-values were determined by the Mann-Whitney test; **p \leq 0.01; *p \leq 0.05; ns p>0.05. The scale bar represents 100 μm (B-D) and 22 μm (F-G).

Figure 4: MADM reveals the presence of ependymal-ependymal and ependymal-astrocyte divisions at E13.5 and E14.5

(A) Experimental schema: Cre plasmid was electroporated *in utero* in *MADM-11^{TG/GT}* at E13.5 or E14.5 and V-SVZ WM were analyzed at P15-20.

(B) Schematic representation of Cre-mediated MADM-clone induction in dividing RGCs. A G2-X event results in clones of red and green labeled cells and a G2-Z event generates double-labeled (yellow) and unlabeled clones of cells. Recombination occurring in the G0/G1 phases of the cell cycle leads to double-labeled (yellow) cells.

(C-G) Airyscan confocal image of a P15 MADM-labeled V-SVZ whole-mount electroporated with a CRE-expressing plasmid at E14.5. Ventricular wall was stained with EGFP (green), tdTomato (red) and FOP (white) antibodies. Double labeled yellow cells issued from a G2-Z recombination event are indicated by yellow arrowheads. Ependymal-ependymal (D-E) and ependymal-astrocyte (F-G) clones of two sister cells are shown at high magnification (D, F) and in a 3D view (E, G). See also [Supplementary movies 1, 2](#).

(H) Percentage of all clones generated from *in utero* electroporation with Cre at E13.5 or E14.5 according to the number of cells per clone (n=6 and 16 animals at E13.5 and E14.5, respectively); p-values were determined with the Chi² test for trend; *p≤0.05.

(I) Average distance between cells composing the clones. Error bars represent the SEM of 29 and 44 clones at E13.5 and E14.5, respectively; p-values were determined with the Mann-Whitney test; **p≤0.01

(J) Percentage of all clones generated from E13.5 or E14.5 containing ependymal cells only or a mixed population of ependymal (E) and astrocytes (B1) cells. Error bars represent the SEM of 29 and 44 clones at E13.5 and E14.5, respectively; p-values were determined with the two-proportion Z-test; *p≤0.05.

(K) Percentage of E and B1 cells in all clones generated from E13.5 or E14.5. Error bars represent the SEM of 117 and 134 cells at E13.5 and E14.5, respectively; p-values were determined with the two-proportion Z-test; *p≤0.05.

(L) Percentage of E-E, E-B1 and B1-B1 cell divisions in all clones generated from E13.5 or E14.5. Error bars represent the SEM of 24 and 54 cell divisions at E13.5 and E14.5, respectively; p-values were determined with the Mann-Whitney test; *p≤0.05.

The scale bar represents 30 μm (C).

Figure 5: GemC1 favors the formation of pure ependymal clones at both E13.5 and E14.5

(A) Experimental schema: GemC1 and Cre plasmids were co-electroporated *in utero* in *MADM-11^{TG/GT}* at E13.5 or E14.5 and V-SVZ WM were analyzed at P15-20.

(B) Airyscan confocal image of a P15 MADM-labeled V-SVZ whole-mount immunostained with EGFP (green), tdTomato (red) and FOP (white) antibodies showing a clone of 2 ependymal cells.

(C) Percentage of all clones generated from co-electroporation with Cre and GemC1 at E13.5 or E14.5 according to the number of cells per clone (n=4 and 9 animals at E13.5 and E14.5, respectively); p-values were determined with the Chi² test for trend; ns, p>0.05.

(D) Average distance between cells composing the clones generated from the co-electroporation of Cre and GemC1 at E13.5 or E14.5. Error bars represent the SEM of 20 and 41 clones at E13.5 and E14.5, respectively; p-values were determined with the Mann-Whitney test; ns, p>0.05.

(E) Percentage of all clones generated from the co-electroporation of Cre and GemC1 at E13.5 or E14.5 containing ependymal cells only or a mixed population of ependymal cells and B1 cells. Error bars represent the SEM of 20 and 41 clones, respectively; p-values were determined with the two-proportion Z-test; ns, p>0.05.

(F) Percentage of E and B1 cells in all clones generated from the co-electroporation of Cre and GemC1 at E13.5 or E14.5. Error bars represent the SEM of 57 and 110 cells at E13.5 and E14.5, respectively; p-values were determined with the two-proportion Z-test; ns, p>0.05.

The scale bar represents 50 μ m.

Figure 6: Geminin favors the formation of B1 cell-containing clones at E14.5

(A) Experimental schema: Geminin and Cre plasmids were co-electroporated *in utero* in *MADM-11^{TG/GT}* at E14.5 and V-SVZ WM were analyzed at P15-20.

(B) Airyscan confocal image of a P15 MADM-labeled V-SVZ whole-mount immunostained with EGFP (green), tdTomato (red) and FOP (white) antibodies showing a clone containing 1 GFP⁺ ependymal cell (arrow), and two B1 cells (one GFP⁺ and one tdT⁺, arrowheads). Note that both B1 cells contain a centrosome at the ventricular surface (arrowheads) and they extend a process toward a blood vessel (yellow asterisks). See also [Supplementary movie 3](#).

(C) Percentage of all clones generated from the co-electroporation of Cre and Geminin at E14.5 according to the number of cells per clone (n=13 animals); p-values of E14.5 control and Geminin were determined with the Chi² test for trend; ns, p>0.05 (compare with [Figure 4H](#)).

(D) Percentage of all clones generated from the co-electroporation of Cre and Geminin at E14.5 and containing either B1 cells only, or ependymal cells only, or a mixed population of ependymal cells and B1 cells. Error bars represent the SEM of 107 clones; p-values were determined with the two-proportion Z-test; ns, $p > 0.05$ for ependymal and mixed clones and $*p \leq 0.05$ for clones containing B1 cells only (compare with E14.5 in [Figure 4J](#)).

(E) Percentage of E and B1 cells in all clones generated from the co-electroporation of Cre and Geminin at E14.5. Error bars represent the SEM of 335 cells; p-values were determined with the two-proportion Z-test; ns, $p > 0.05$ (compare with E14.5 in [Figure 4K](#)).

(F) Percentage of E-E, E-B1 and B1-B1 cell division in clones generated from E14.5 in controls, or after overexpression of GemC1 or Geminin. Error bars represent the SEM of 16, 9 and 13 independent animals electroporated with Cre, Cre+GemC1 or Cre+Geminin, respectively; p-values were determined with the Mann-Whitney test; $***p \leq 0.001$, $**p \leq 0.01$, $*p \leq 0.05$ and ns, $p > 0.05$.

The scale bar represents 50 μm .

Figure 7. Ependymal cells and B1 astrocytes form one common lineage regulated by Geminin family members.

(A) Model of adult NSCs and multiciliated ependymal cells generation. RGCs give rise to type B1 cells through symmetric divisions (rare event: 3%) or asymmetric divisions (frequent event 50%) and to multiciliated ependymal cells through symmetric divisions (frequent event: 47%). The antagonistic Geminin family members, Geminin and GemC1, can modulate the cell fate decision. Geminin overexpression favors symmetric divisions giving rise to type B1 astrocytes. On the contrary, GemC1 overexpression triggers symmetric divisions giving rise to ependymal cells. The percentage of E-E, E-B1 and B1-B1 divisions are indicated for IUE at E14.5 in a control situation and upon GemC1 or Geminin overexpression, respectively.

MATERIALS AND METHODS

Mouse lines

Mice were bred and the experiments were performed in conformity with French and European Union regulations and the recommendations of the local ethics committee. The date of the vaginal plug was recorded as embryonic day (E) 0.5 and the date of birth as

postnatal day (P) 0. Emx1-Cre (JAX stock #005628, [Gorski et al., 2002](#)), Gsh2-Cre (a gift from the laboratory of N. Kessaris, [Kessaris et al., 2006](#)) and Nkx2.1-Cre (JAX stock #008661, [Xu et al., 2008](#)) transgenic animals were crossed with R26:tdTomato^{mT/mT} animals (Ai14, [Madisen et al., 2010](#)). MADM^{GT/+} and MADM^{TG/+} transgenic animals were a gift from the laboratory of S. Hippenmeyer ([Hippenmeyer et al., 2010](#)). Heterozygous mice were crossed to obtain homozygous MADM^{GT/GT} and MADM^{TG/TG} animals. These homozygous mice were then mated to obtain MADM^{GT/TG} embryos. Expression of the Cre Recombinase in MADM^{GT/TG} embryos was achieved by *in utero* electroporation of pcX-Cre plasmid (1µg/µl, [Morin et al., 2007](#)) at E13.5 or E14.5. All transgenic mice lines were kept as B6D2F1/J or C57/Bl6 background. For the other experiments, RjORL:SWISS mice were used because of their fertility and their maternal instinct.

EdU administration and detection

To determine the cell cycle stage at the time of electroporation, 50 mg/kg body weight (8 mg/ml stock, dissolved in filtered PBS) of EdU (Fisher Scientific, cat. no. 11590926) was administered to pregnant mice by intraperitoneal injection 2 hours before and 2 hours after *in utero* electroporation. To assess the neurogenic potential of SVZ astrocytes, EdU was administered for 14 days through the drinking water (1 mg/ml) of P21 electroporated litters. EdU incorporation was detected using the Click-iT™ EdU Alexa Fluor imaging kit (ThermoFisher Scientific C10339 for Alexa Fluor™ 594 staining or C10340 for Alexa Fluor™ 647 staining), according to manufacturer's protocol. Briefly, fixed coronal sections were permeabilized in blocking solution with 0.1% Triton X-100 and 10% fetal bovine serum in PBS for 1h. After washing with PBS, sections were incubated for 1 hour with the Click-iT™ reaction cocktail, protected from light. The sections were washed again and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies. After incubation with the secondary antibody for 2 hours and Hoechst staining, slices were mounted with Fluoromount-G (Southern Biotech cat. no. 0100-01) mounting medium.

***In utero* electroporation**

In utero electroporation of mouse embryos was performed at E13.5 and E14.5. Pregnant females were injected subcutaneously with buprenorphine (0.1 mg/kg) 15 minutes prior to surgery. They were subsequently anaesthetized by isoflurane inhalation, the abdominal cavity

opened and the uterine horns exposed. With a thin glass capillary (Harvard Apparatus 30-0019), 1µl of plasmid in filtered PBS was injected together with FastGreen (0.025%, Sigma F7252) into the lateral ventricles of the embryo. The final concentrations of plasmids were 1 µg/µl *^{PB}CAG-Nucbow*, 0.5 µg/µl *CAG-hypBase*, 0.1 µg/µl *CAG-seCre* (Loulier et al., 2014), 1 µg/µl *CAG-H2B-GFP* (a gift from the laboratory of X. Morin, Hadjantonakis and Papaioannou, 2004), 1µg/µl pCAGGS -Cre (a gift from the laboratory of X. Morin, Morin et al., 2007), or 1µg/µl pCAGGS-GemC1 or pCAGGS-Geminin (gifts from the laboratory of S. Taraviras, Kyrousi et al., 2015).

Immediately after injection, four 50ms 35V pulses were applied to embryos at 950 ms intervals with an electroporator (CUIY21 EDIT, Nepagene). Finally, the embryos were carefully placed back into the abdominal cavity and left to develop before sacrifice.

Tissue collection and immunostaining

When the immunostaining and analyses were to be performed on coronal sections, the mice, previously anesthetized with a mixture of 100 mg of ketamine and 10 mg of xylazine per kg of body weight, were perfused transcardially with 4% PFA. After overnight fixation of the dissected brain in 4% PFA at 4°C, 80 µm-thick floating sections were cut on a vibratome.

Wholemounds of the lateral walls of the lateral ventricles were dissected (Mirzadeh et al., 2010) and fixed for 15 minutes in 4% PFA at room temperature. Samples were incubated for 1h in blocking solution (1X PBS with 0.1-0.2% Triton-X100 and 10% fetal bovine serum) at room temperature. Wholemounts and floating sections were incubated overnight at 4°C in the primary antibodies diluted in blocking solution. The next day, they were stained with species-specific Alexa Fluor secondary antibodies (Invitrogen) and Hoechst solution protected from light for 2h at room temperature. Finally, the wholemounts were redissected to keep only the thin lateral walls of the lateral ventricle (Mirzadeh et al., 2010) which were mounted with Vectashield mounting medium (H-1000, Sigma), for Nucbow-positive samples, or Fluoromount-G mounting medium (Southern Biotech cat. no. 0100-01), for other stainings. Fluoromount-mounted slides were stored at 4°C; Vectashield-mounted slides were stored at -20°C to avoid color fading. The primary antibodies used were CD24 (1:200, BD Pharmingen, cat. no. 557436), FoxJ1 (1:500, eBioscience, cat. no. 14-9965-82), GFP (1:1600, Aves, cat. no. GFP-1020), Dsred (1:400, Clontech, cat. no. 632496), Sox9 (1:1200, Millipore, cat. no.

AB5535), FOP (1:600, Abnova, cat. no. H00011116-MO1), ZO1 (1:100, Life Technologies, cat.no. 402200) and GTU88 (1:500, Sigma, cat.no. T6557).

Imaging

Fixed slices or lateral ventricle wholemounts were examined with an upright Zeiss Axio Observer.ZI epifluorescence microscope, using an Apochromat 63 x 1.4 NA objective and a Zeiss Apotome with an H/D grid.

Confocal image stacks were collected with a 40 x 1.3 NA objective on Olympus FV1000 and FV1200 microscopes or with a 40 x 1.4 NA oil objective on an inverted LSM 880 Airyscan Zeiss microscope with 440, 515, 560 and 633 laser lines to excite, independently, Cerulean, mEYFP, mCherry and Alexa 647/Cy5,

Image and Statistical Analysis

Quantification, image and statistical analyses were performed with Fiji ([Schindelin et al., 2012](#)), Matlab (Mathworks, USA), Excel, and GraphPad Prism software.

Automatic MAGIC Markers image analysis

For clarity, mCherry, EYFP and Cerulean Nucbow signals are represented as red, green and blue (RGB) values. 1) **Local apical layer extraction:** to maintain consistency among datasets, only cells within 25 μm of the apical surface were considered using the SME projection tool on the FoxJ1-stained cell nuclei ([Shihavuddin et al., 2017](#)). 2) **Segmentation of ependymal cells stained with FoxJ1:** the 3D volume occupied by each cell nucleus was delineated using FoxJ1 far red staining. RGB information was extracted from the segmented mask using the following steps implemented as a FIJI macro: Noise was reduced in a preprocessing step using 3D Gaussian filtering, where the sigma values of the Gaussian kernel was set to $1/3^{\text{rd}}$ of the estimated mean nuclear radius in 3D. This was followed by Log3D filtering ([Sage et al., 2005](#)) to select objects corresponding to nuclear size; the local 3D maximum was then detected to determine the center of each cell nucleus. 3D-seeded watershed segmentation was performed from these maxima to accurately detect the nuclear border in 3D. This 3D segmentation mask was used to compute the volume and the mean color of each nucleus. 3) **Segmentation of non-ependymal cells:** After elimination of FoxJ1-positive ependymal cells, only FoxJ1-negative non-ependymal cells remained in the 25 μm apical layer. Since there is no

specific marker for these cells, they were characterized by their color information as follows: **Projection:** projection of the Nucbow color channels was maximized to obtain a 2D representation of all labeled non-ependymal cells. **Color gradient extraction:** In order to accentuate nuclear borders, the image gradient was computed from the sum of the intensities of the three RGB channels. The gradient image was further filtered with adaptive Gaussian filtering to improve the signal to noise ratio. The adaptive filter augments smoothing where the image gradient is weak and decreases smoothing where the gradient is high, in order to preserve nuclear edges. **Watershed segmentation:** Local maxima were extracted from the inverted smoothed gradient response to retrieve one maximum per nucleus. The seeded watershed transform was then used (Ollion et al., 2013) to detect cells in 2D. 4) **Color normalization:** RGB channels were rescaled linearly from 0 and the 99th percentile of their intensity distribution to ensure alignment of their relative intensity (1% of the most saturated cells were therefore excluded from the analysis of each sample). 5) **Determination of clonal lineage:** To identify the cell lineage, each cell was characterized by the median R G B values and their spatial location in 3D X, Y, Z. RGB values were converted to their equivalent in the HSV (Hue, Saturation, Value) color space as described in Loulier et al., 2014. This conversion was performed in MATLAB with the HEXCONE model proposed by Smith et al., 1978.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary Figure 1: Ependymal cells derived from E15.5 progenitors are closer than random at P15

(A) Experimental schema for (B): Timed-pregnant female mice received one injection of EdU at E15.5 and wholemounts of the V-SVZ of the offspring were analyzed at P15.

(B) Triple immunolabeling with ZO1 (green), EdU (red) and GTU88 (basal body marker, blue) and 2D map of EdU⁺ ependymal cells. SME projection was used to extract a 2D image of the surface in the vicinity of the apical layer of the 3D stack. Watershed segmentation was then performed on 2D image, using local maxima of the adaptive gaussian-smoothed input image as seeds. The segmented cells were then classified in EdU⁺ (red) or EdU⁻ (white) ependymal cells with a rule-based classifier applied to texture features computed from each single segmented cell. (C) Nearest neighbor distance analysis of EdU⁺ ependymal cells (with multiple GTU88⁺ basal bodies) in the P15 V-SVZ injected with EdU at E15.5. According to the average

amount and proportion of EdU⁺ cells observed in 24 images obtained from 5 different mouse brains, 500 artificial images were generated, each containing a regular hexagonal grid of 345 cells with a 0.065 probability of being randomly EdU⁺. From there, a distribution of the distance of the closest EdU⁺ cell from each EdU⁺ cell was obtained with the distance defined as the number of cells between two EdU⁺ cells. A mean of the 500 cumulative distributions are represented by the black curve in panel (C) with the standard deviation. The red curve represents the same computed results made on the real dataset of 25 images. Data are presented as the mean \pm SD. The p-value was determined with the non-parametric Kolmogorov-Smirnov test for 2 samples; $p \leq 0.0001$. The scale bar represents 25 μm .

Supplementary Figure 2: *In utero* electroporation targets proliferating radial glia progenitors

(A) Experimental schema for (B): Timed-pregnant female mice received a single injection of EdU 2 hours before and after *in utero* electroporation of H2B-GFP at E13.5 (B) or E14.5 (C) and coronal sections of the forebrain were analyzed 24 hours later.

(B-C) EdU labeling on coronal sections of the H2B-GFP⁺ brains, 24 hours after the electroporation.

(D) Percentage of GFP⁺EdU⁺ among all GFP⁺ cells one day after the electroporation at E13.5 or E14.5. Data are presented as the mean \pm SEM. The p-value was determined by the Mann-Whitney test; ns, $p > 0.05$, $n = 3$ experiments. VZ, ventricular zone; SVZ, subventricular zone. The scale bar represents 75 μm .

Supplementary Figure 3: Methodology for the detection of FoxJ1⁺ and FoxJ1⁻ Nucbow⁺ cells

(A-B) Representative raw images of an *en-face* view of the V-SVZ electroporated at E14.5 with ^{PB}CAG-Nucbow along with the PiggyBac transposase and the self-excising Cre recombinase (A) and immunostained at P15 with FoxJ1 antibody (B). (C) 25 μm 3D-segmentation of FoxJ1⁺ cells outlined in yellow using Gaussian smoothing, Log3D filtering and 3D watershed segmentation implemented as a FIJI macro (see methods). (D-E) Segmented images of Nucbow⁺FoxJ1⁻ and Nucbow⁺FoxJ1⁺ cells, respectively. The scale bar represents 300 μm .

Supplementary Figure 4: Color analysis of manually selected Nucbow⁺ clones

(A) 49 couples of cells were manually selected by 2 independent researchers from 4 different electroporated brains with ^{PB}CAG-Nucbow along with the PiggyBac transposase and the self-

excising Cre recombinase at E14.5. (B-C) Circular Hue-Saturation (B) and Hue-Value (C) plots of manually selected Nucbow⁺ cells shown in (A). (D-G) Hue, Saturation, Value differences and spatial distance between each cell of the manually selected Nucbow⁺ clones shown in (A). The red arrows indicate the thresholds chosen for the automatic analysis. The scale bar represents 15 μm .

Supplementary Figure 5: Color analysis of Nucbow⁺ clones

(A-B) Map of Nucbow⁺ clones containing 2 to 6 ependymal cells (A) or a mixed population of FoxJ1⁺ and FoxJ1⁻ cells (B). (C-D) Circular Hue-Saturation and Hue-Value plots of all depicted Nucbow⁺ cells from (A-B), respectively. (E-F) Examples of ependymal cell clones formed by 2, 3 or 6 FoxJ1⁺ cells (E) and clones containing at least one FoxJ1⁺ cell formed by 2, 3, 4 or 6 cells. In all maps, FoxJ1⁺Nucbow⁺ cells are outlined in white. (G) Normalized circular histogram of Hue values of cells contained in clones of 2 to 6 cells (small clones, white) or clones of 7 to 32 cells (big clones, black). Cells from big clones are more frequent around primary colors compared to cells from small clones (Kolmogorov-Smirnov test, $p=0.001$). The scale bar represents 100 μm (A-B, E-F).

Supplementary Figure 6: GemC1 expression induces ependymal cell differentiation at the expense of B1 cells

(A) Experimental schema: GemC1 and/or H2B-GFP plasmids were electroporated *in utero* at E14.5 and V-SVZ WM or coronal sections were analyzed at P15.

(B-C) Confocal image of coronal sections of the forebrain at P15 immunostained with GFP and FOP antibodies (red), previously electroporated with H2B-GFP (B) or GemC1 and H2B-GFP (C). Ependymal cells are identified by the co-localisation with the basal body marker FOP. VZ: ventricular zone; SVZ: Subventricular zone.

(D) Percentage of GFP⁺FOP⁺ ependymal cells among all GFP⁺ cells. Data are presented as the mean \pm SEM. The p-value was determined by the Mann-Whitney test; *** $p\leq 0.001$, $n=3$.

(E) Confocal image of the V-SVZ WM at P15 immunostained with GFP (green), the basal body marker FOP (red) and ZO1 (white) antibodies. (F-G) High magnification images of the insets in (E) showing that pinwheel structures are absent when most cells express GemC1 (F) whereas pinwheels (arrows in G) are present in regions weakly electroporated with GemC1.

The scale bar represents 50 μm in (B-C) and 200 μm in (E).

Supplementary Movie 1: 3D analysis of a pure ependymal (ependymal-ependymal) clone at P15 following Cre expression in a MADM-embryo at E14.5 (related to Figure 4)

Supplementary Movie 2: 3D analysis of a mixed (ependymal-type B1 astrocyte) clone at P15 following Cre expression in a MADM- embryo at E14.5 (related to Figure 4)

Supplementary Movie 3: 3D analysis of a mixed (ependymal-type B1 astrocyte) clone at P15 following Geminin and Cre expression in a MADM- embryo at E14.5 (related to Figure 6)

Supplementary Table 1: MADM lineage tracing after Cre expression at E13.5 or E14.5 (related to Figure 4)

Cre activity was induced through IUE in MADM embryos at E13.5 or E14.5 and red-green clones were analyzed on V-SVZ at P15-P20. B=Type B1 astrocytes; E=Ependymal cells; M=Mixed clones; E= Ependymal clones.

Supplementary Table 2: MADM lineage tracing after Cre and GemC1 overexpression at E13.5 or E14.5 (related to Figure 5)

GemC1 overexpression together with Cre activity was induced through IUE in MADM embryos at E13.5 or E14.5 and red-green clones were analyzed on V-SVZ at P15-P20. B=Type B1 astrocytes; E=Ependymal cells; M=Mixed clones; E= Ependymal clones.

Supplementary Table 3: MADM lineage tracing after Cre and Geminin overexpression at E14.5 (related to Figure 6)

Geminin overexpression together with Cre activity was induced through IUE in MADM embryos at E14.5 and ref-green clones were analyzed on V-SVZ at P15-P20. B=Type B1 astrocytes; E=Ependymal cells; M=Mixed clones; E=Ependymal clones.

Figure 1

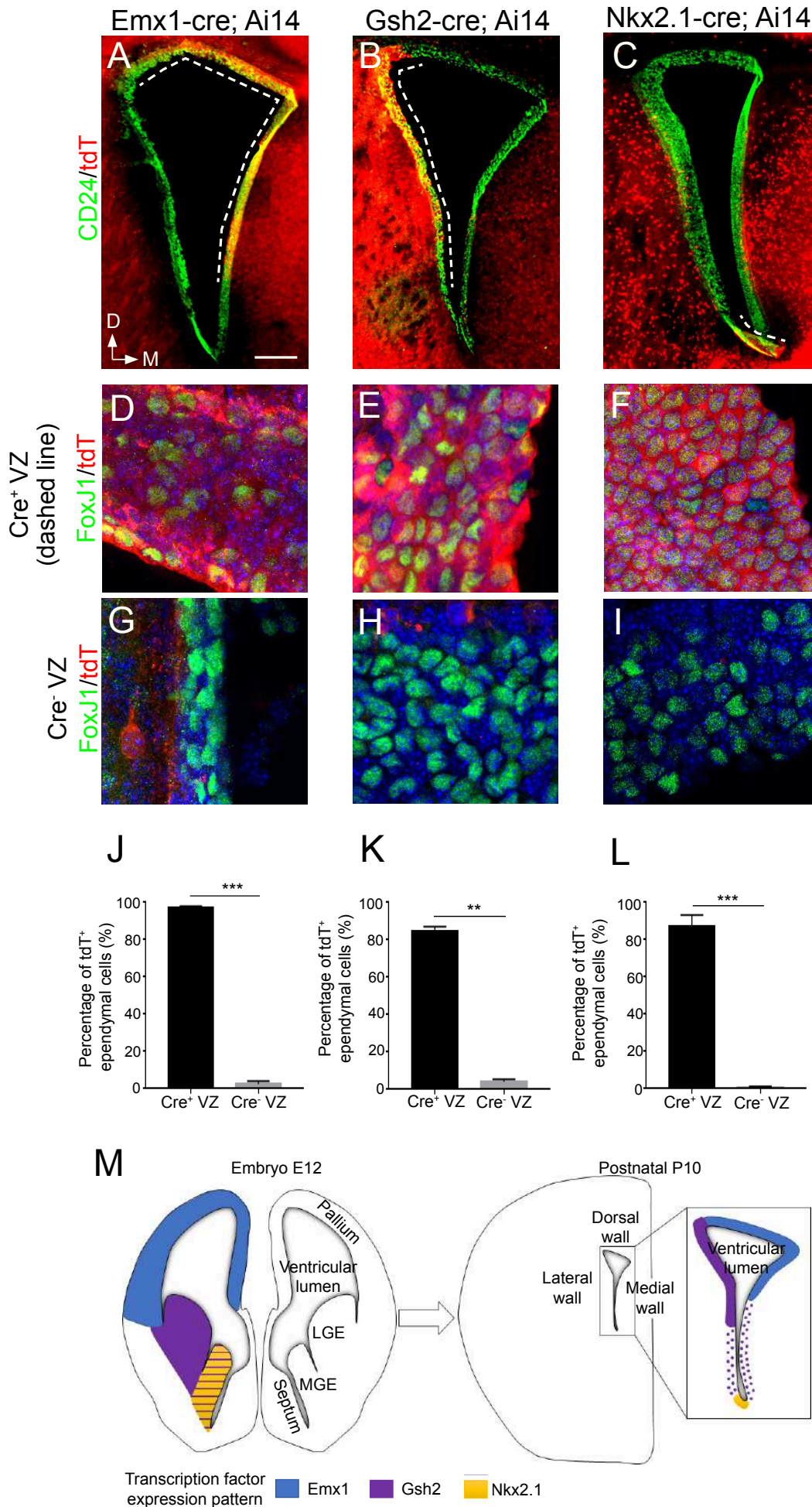
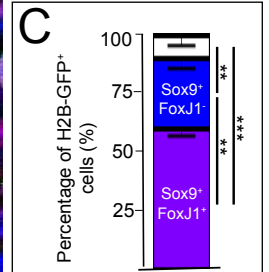
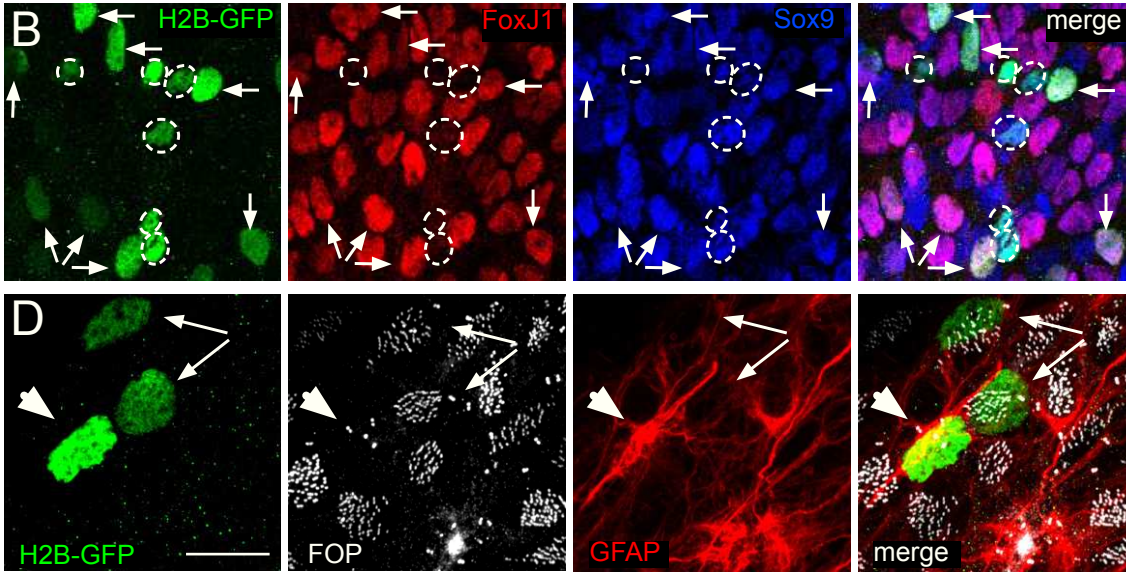
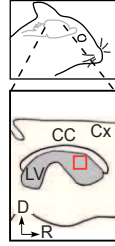
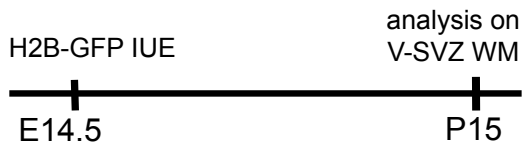


Figure 2

A



E

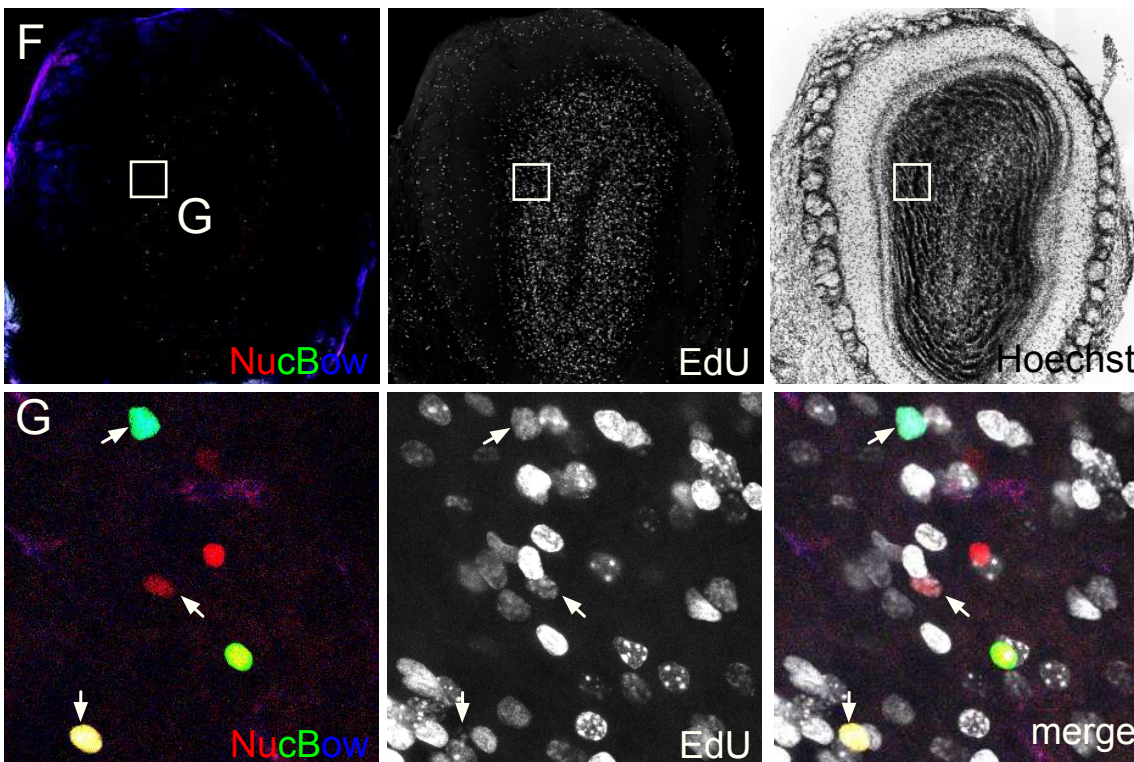
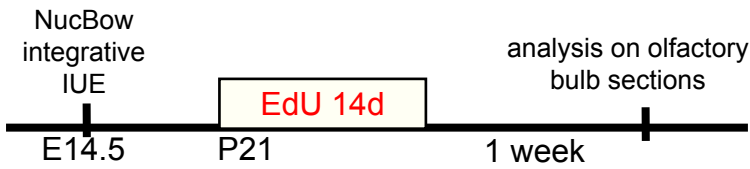


Figure 3

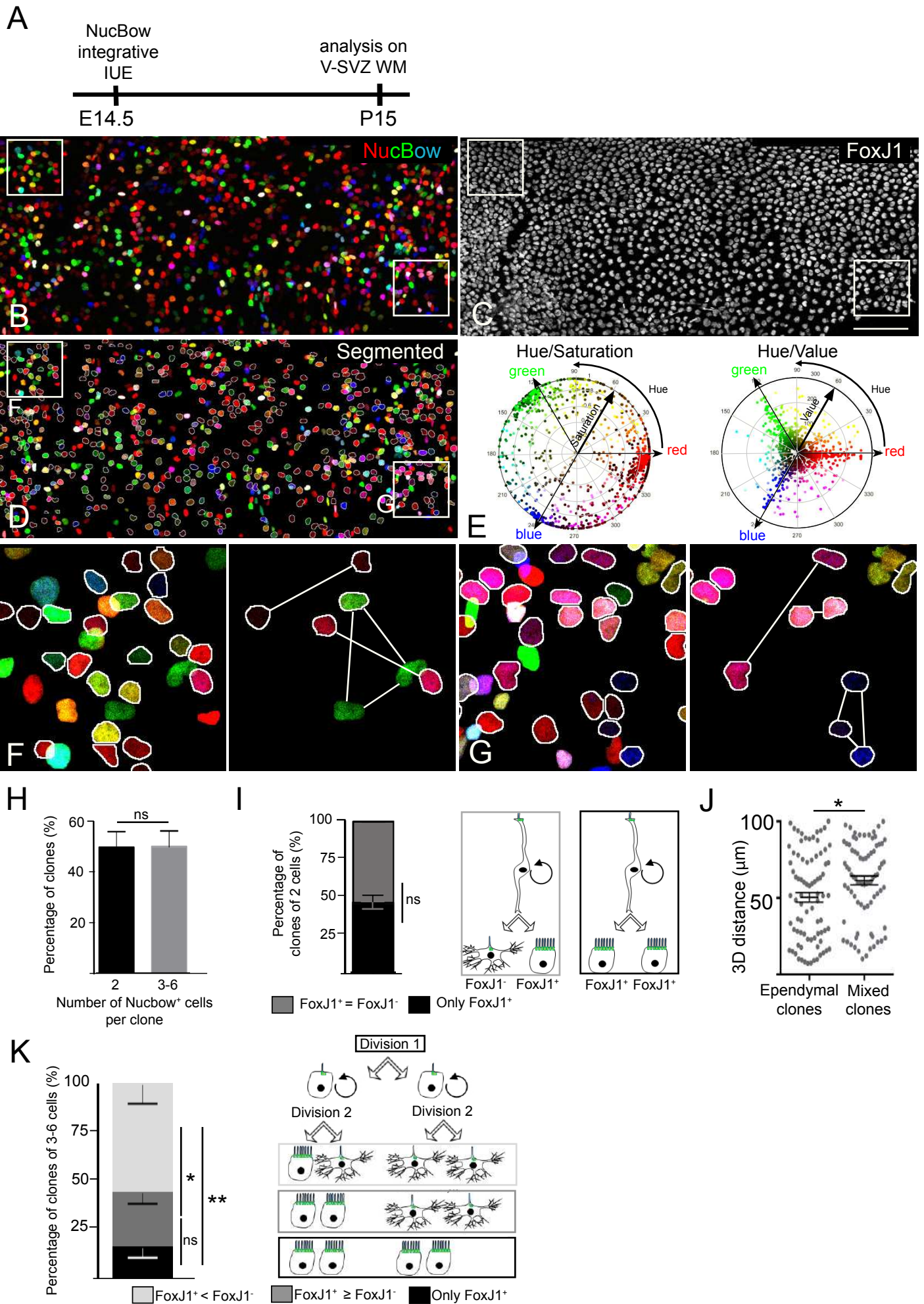


Figure 4

A

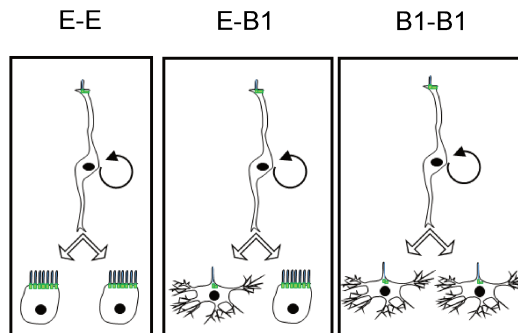
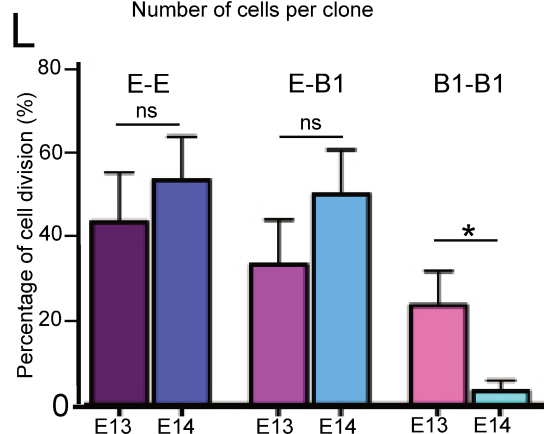
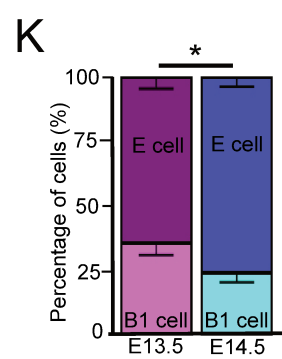
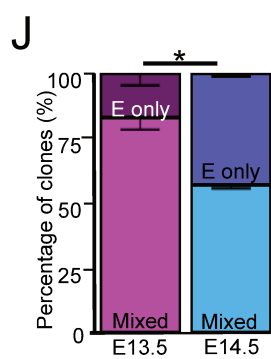
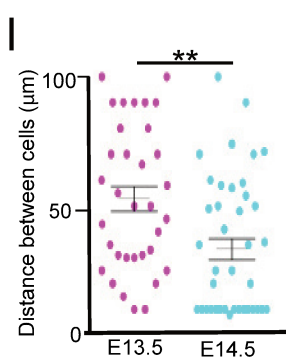
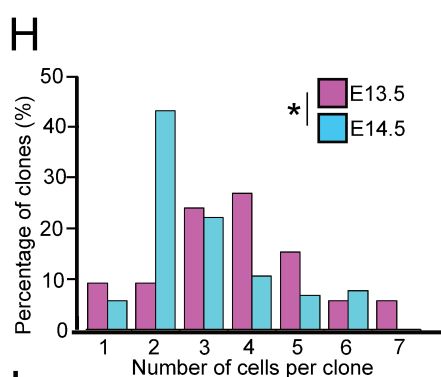
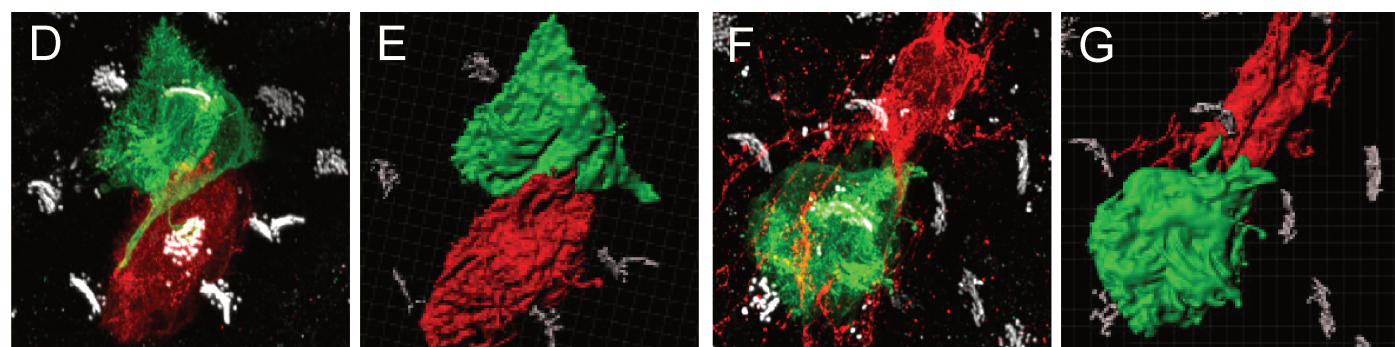
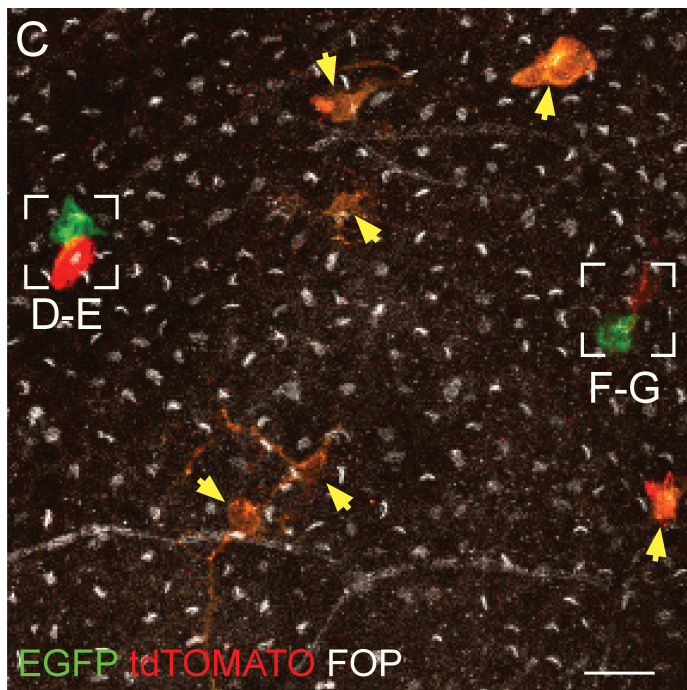
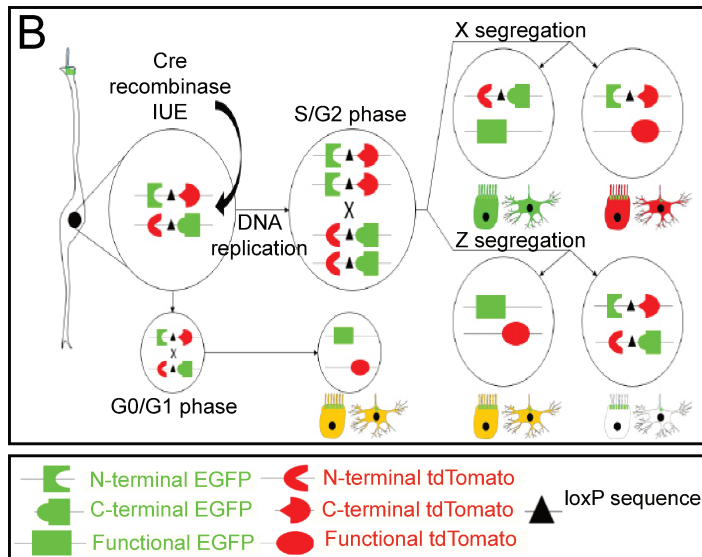
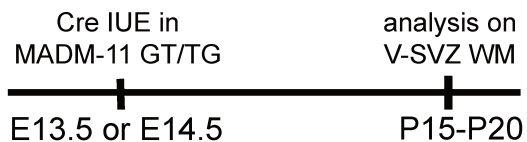
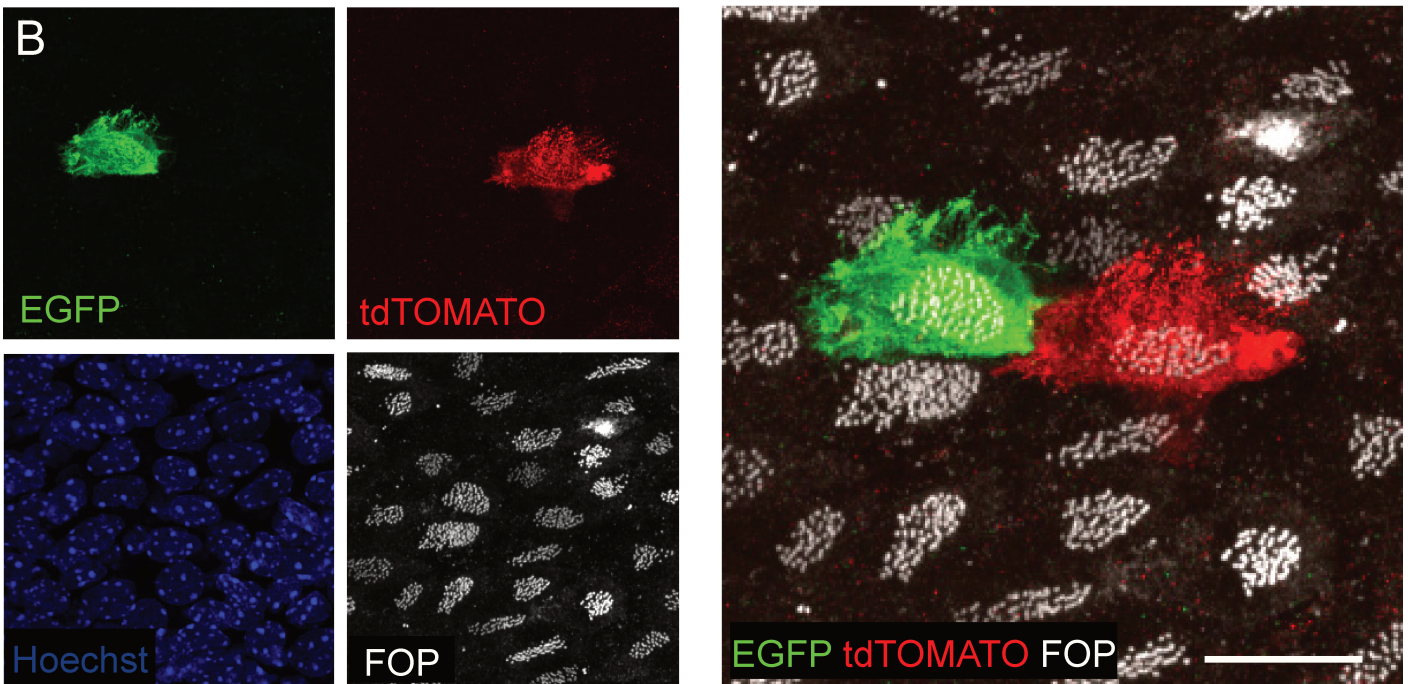
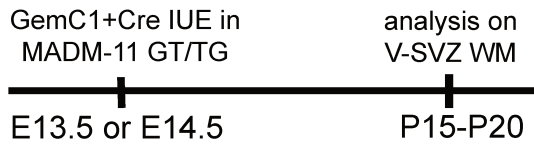
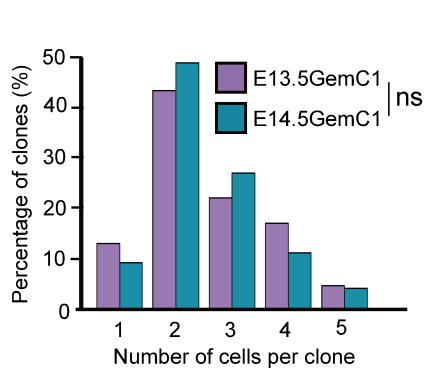


Figure 5

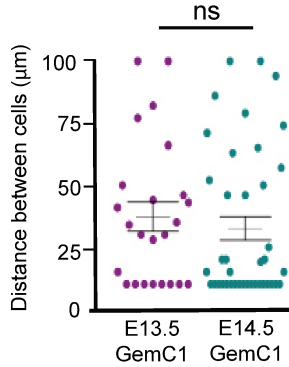
A



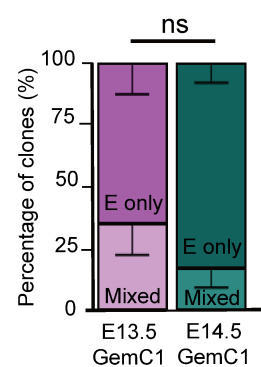
C



D



E



F

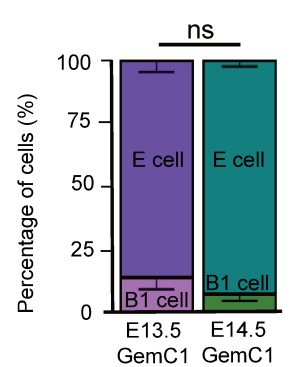
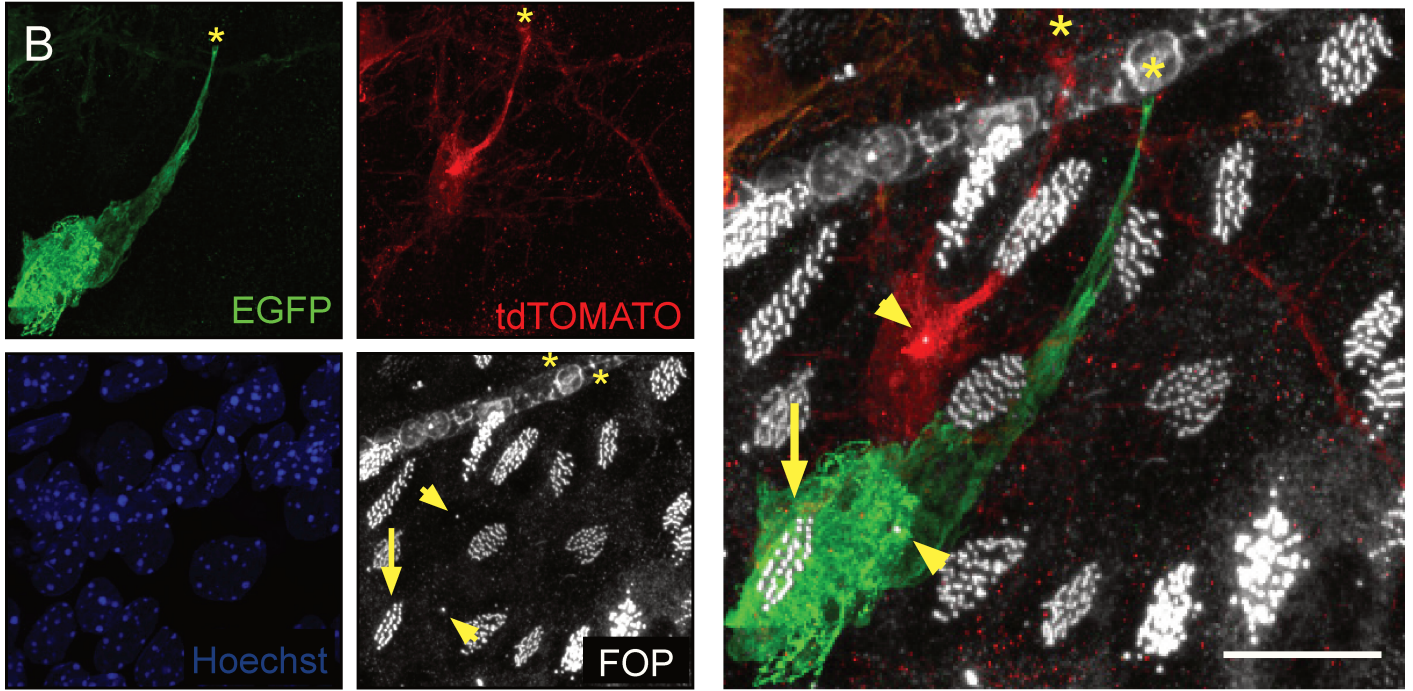
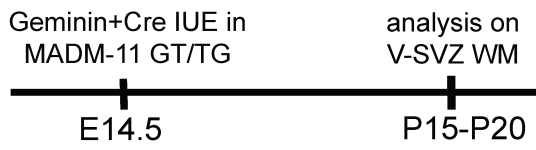
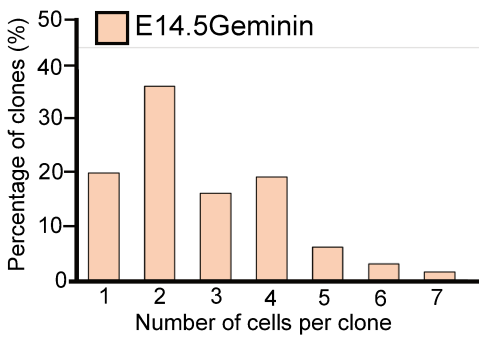


Figure 6

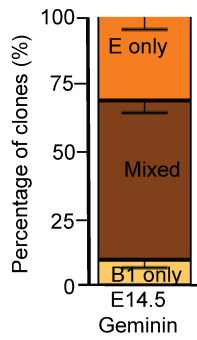
A



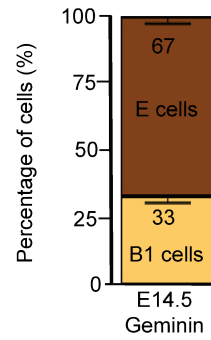
C



D



E



F

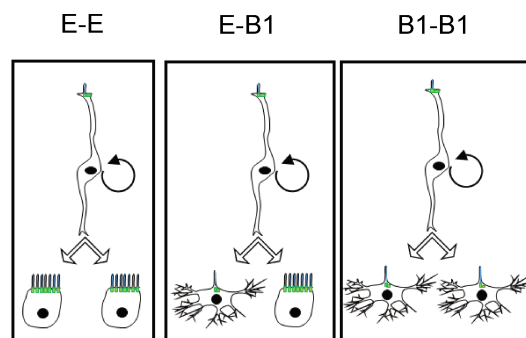
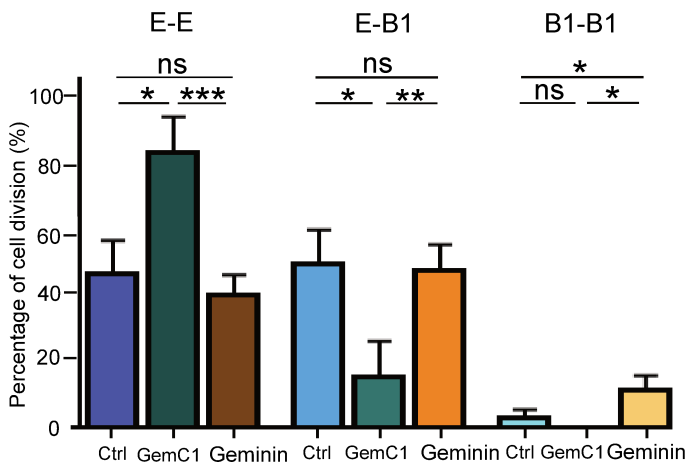
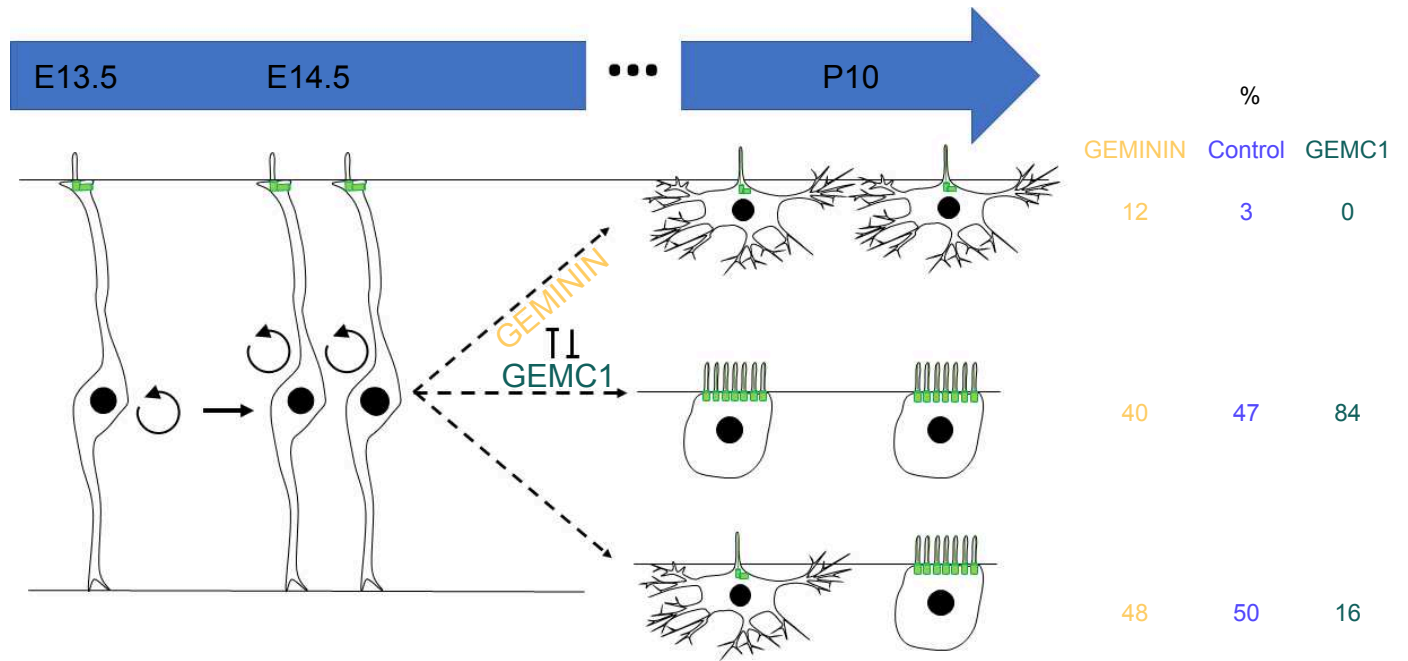


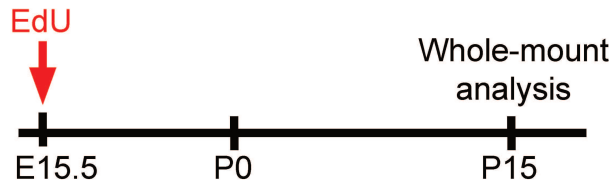
Figure 7

A

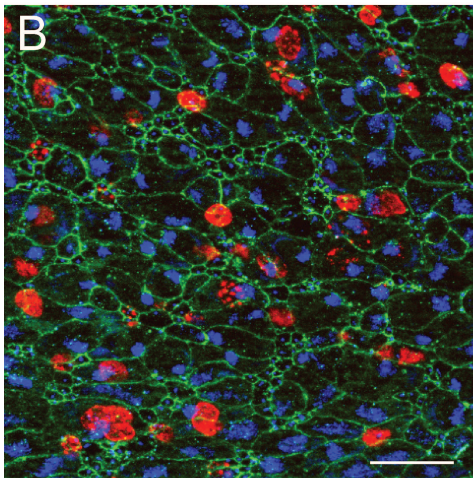


Supplementary Figure 1

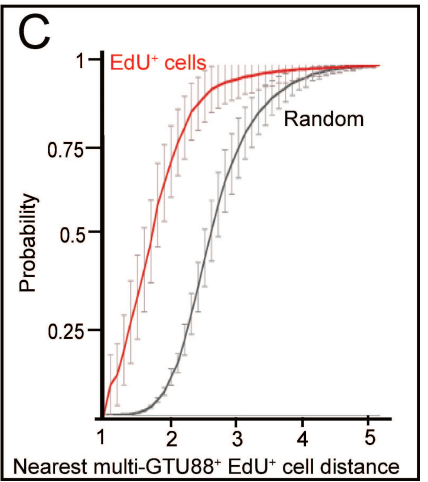
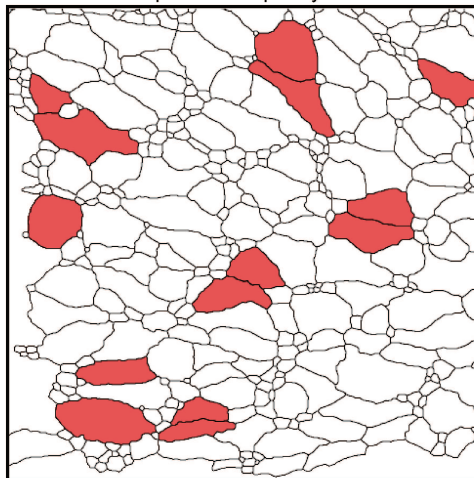
A



ZO1 / EdU / GTU88

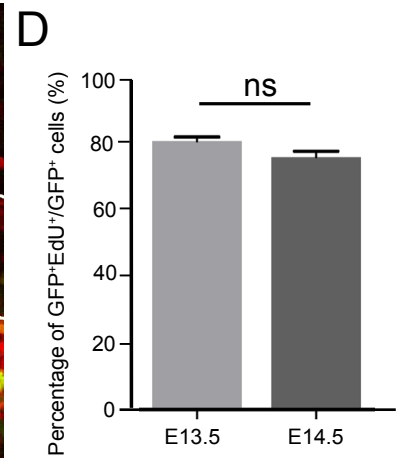
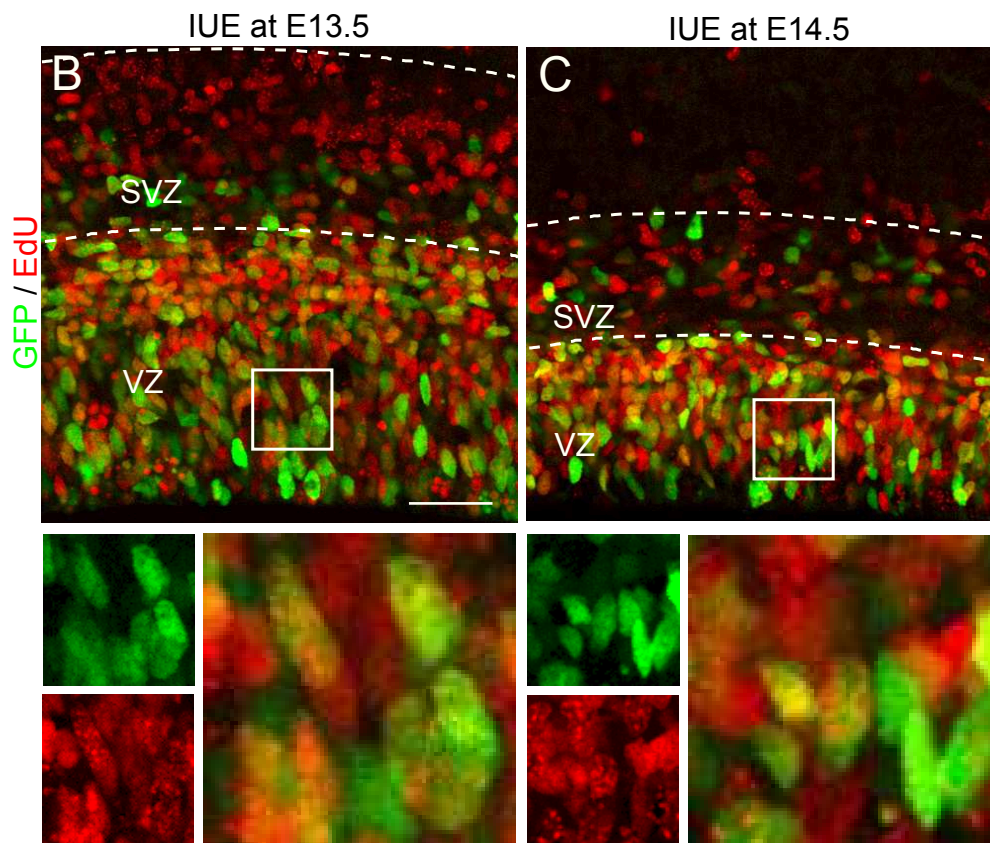
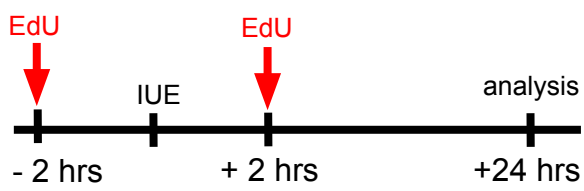


2D map of EdU⁺ ependymal cells

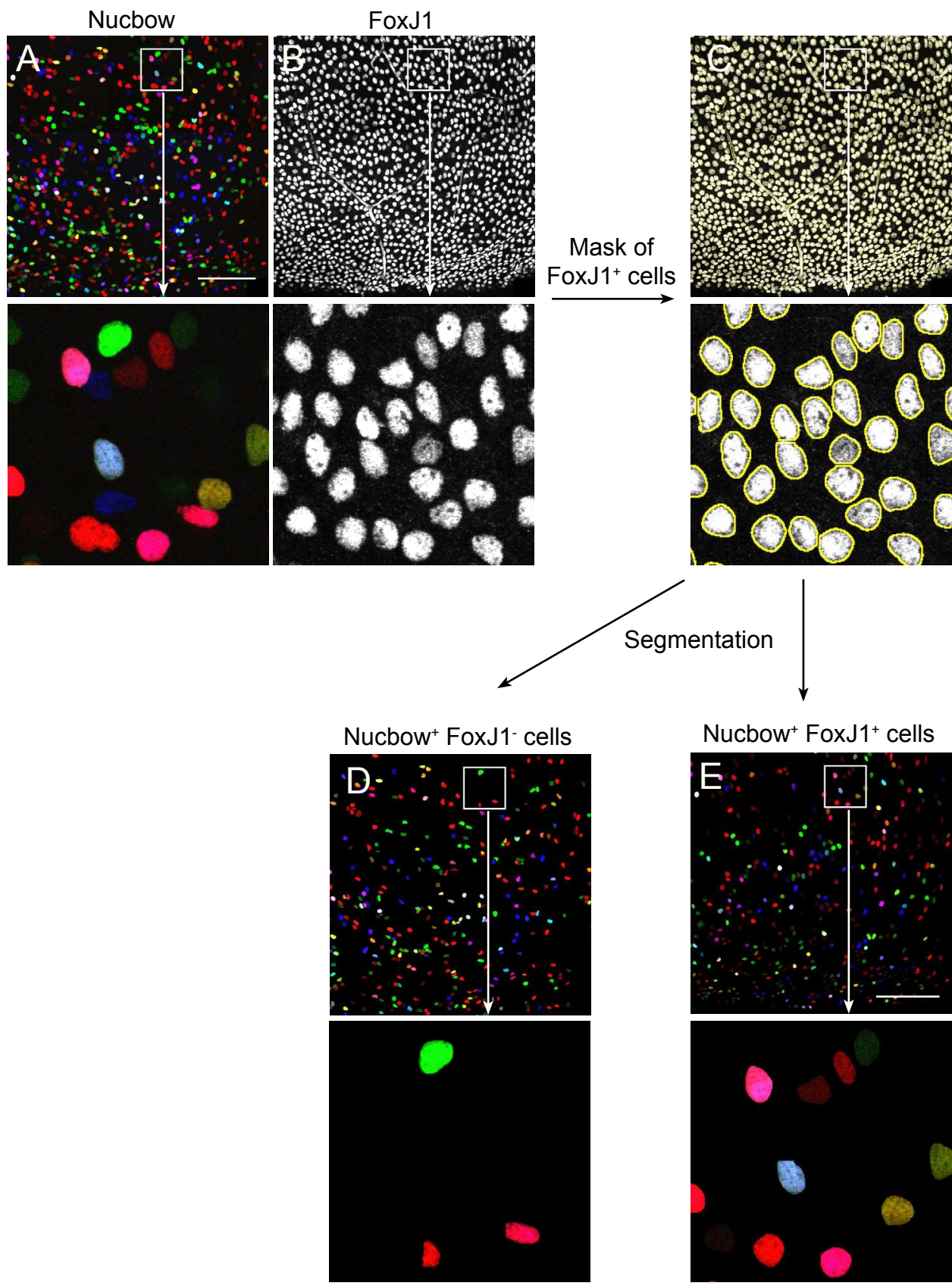


Supplementary Figure 2

A

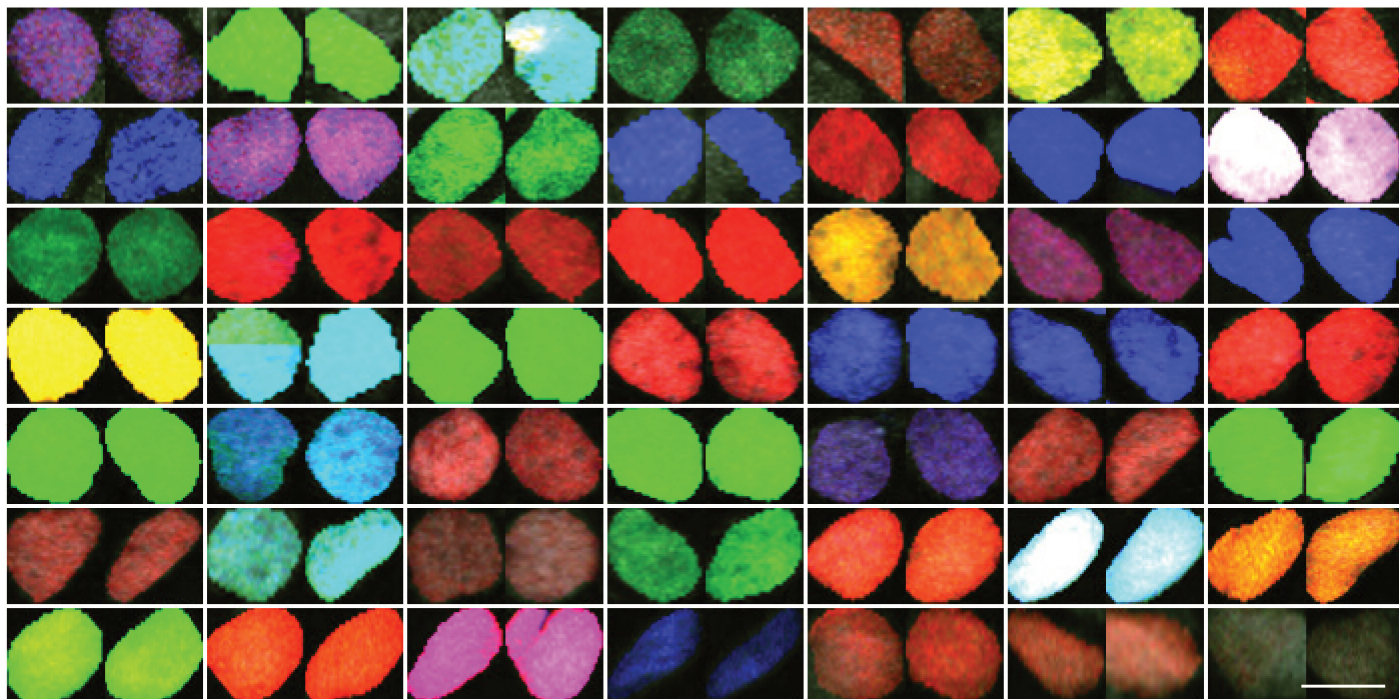


Supplementary Figure 3

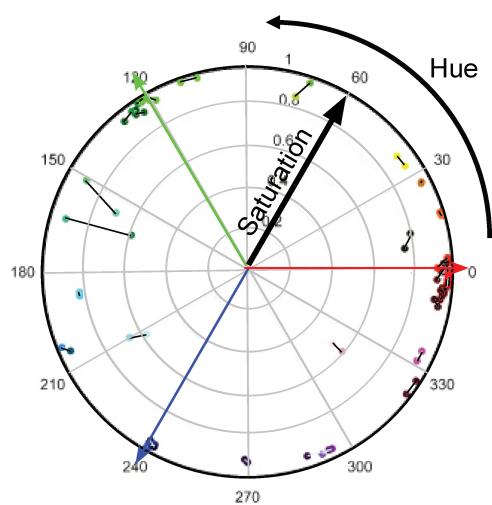


Supplementary Figure 4

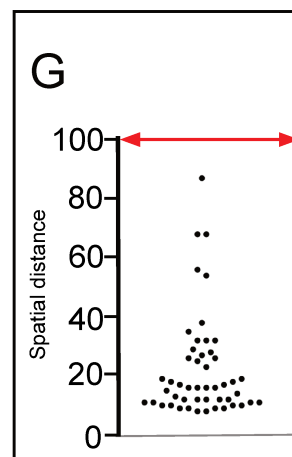
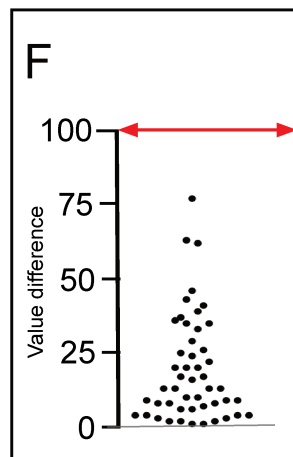
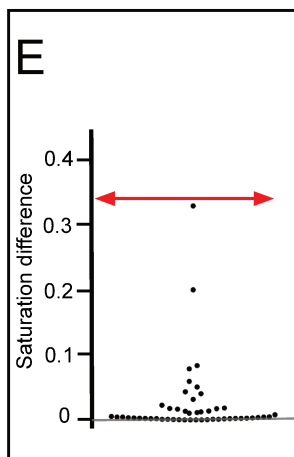
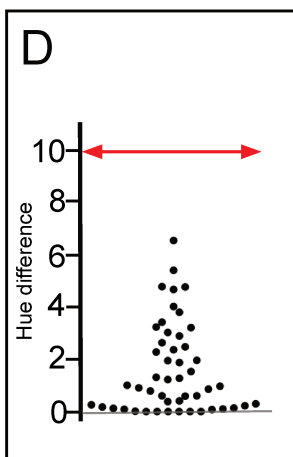
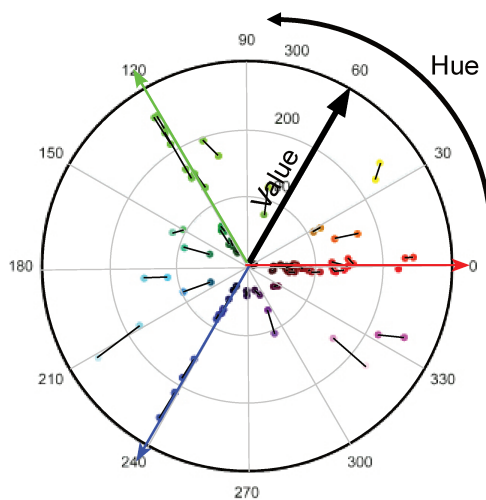
A



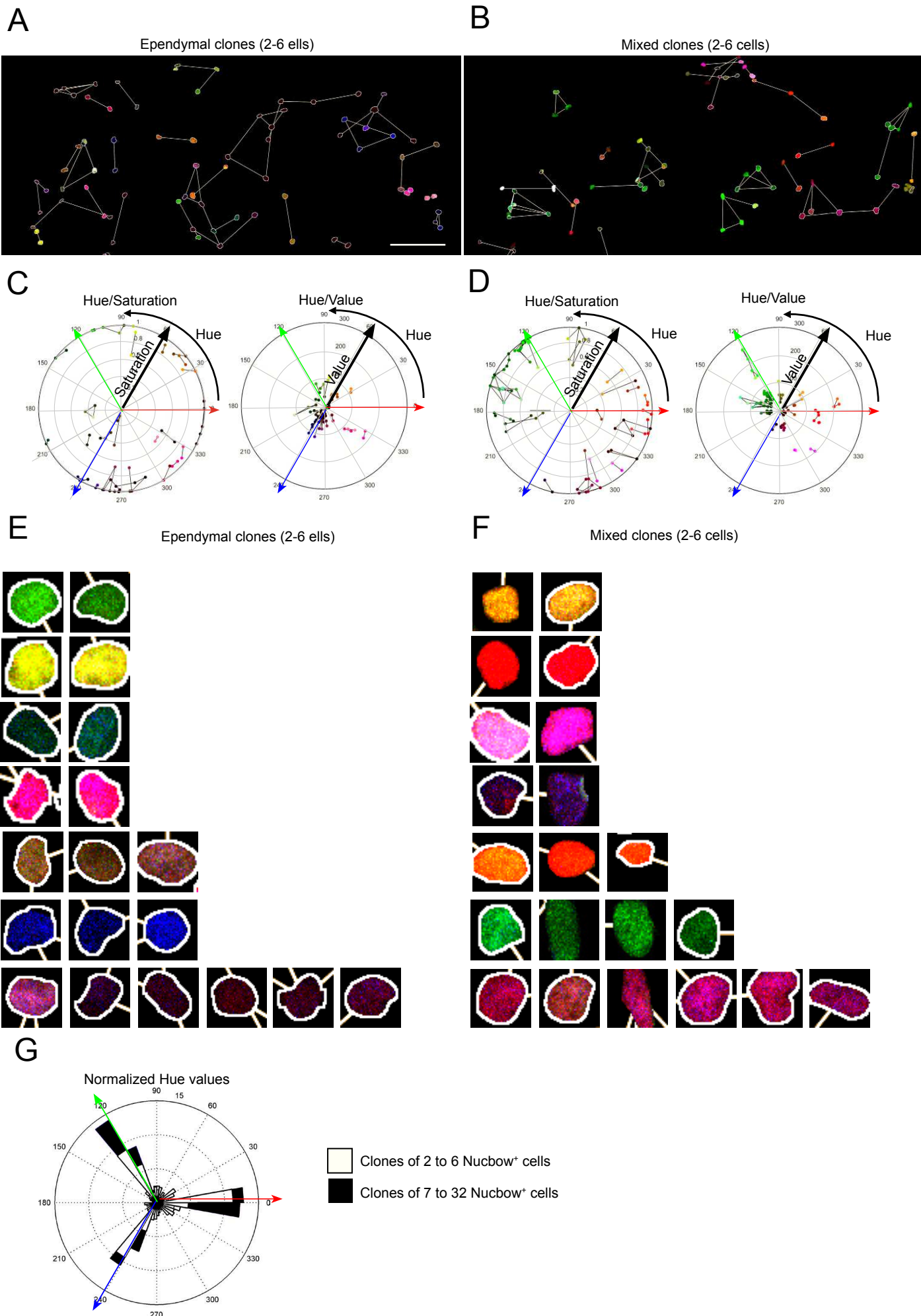
B Hue/Saturation



C Hue/Value



Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 6

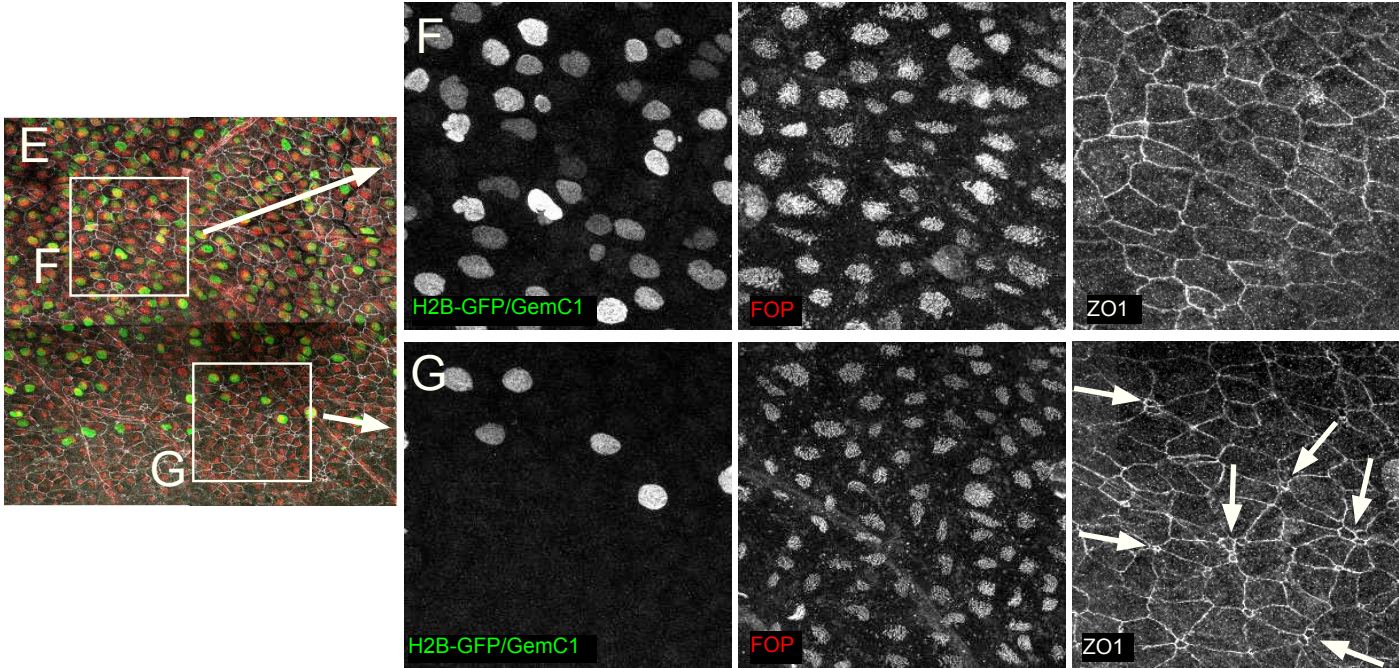
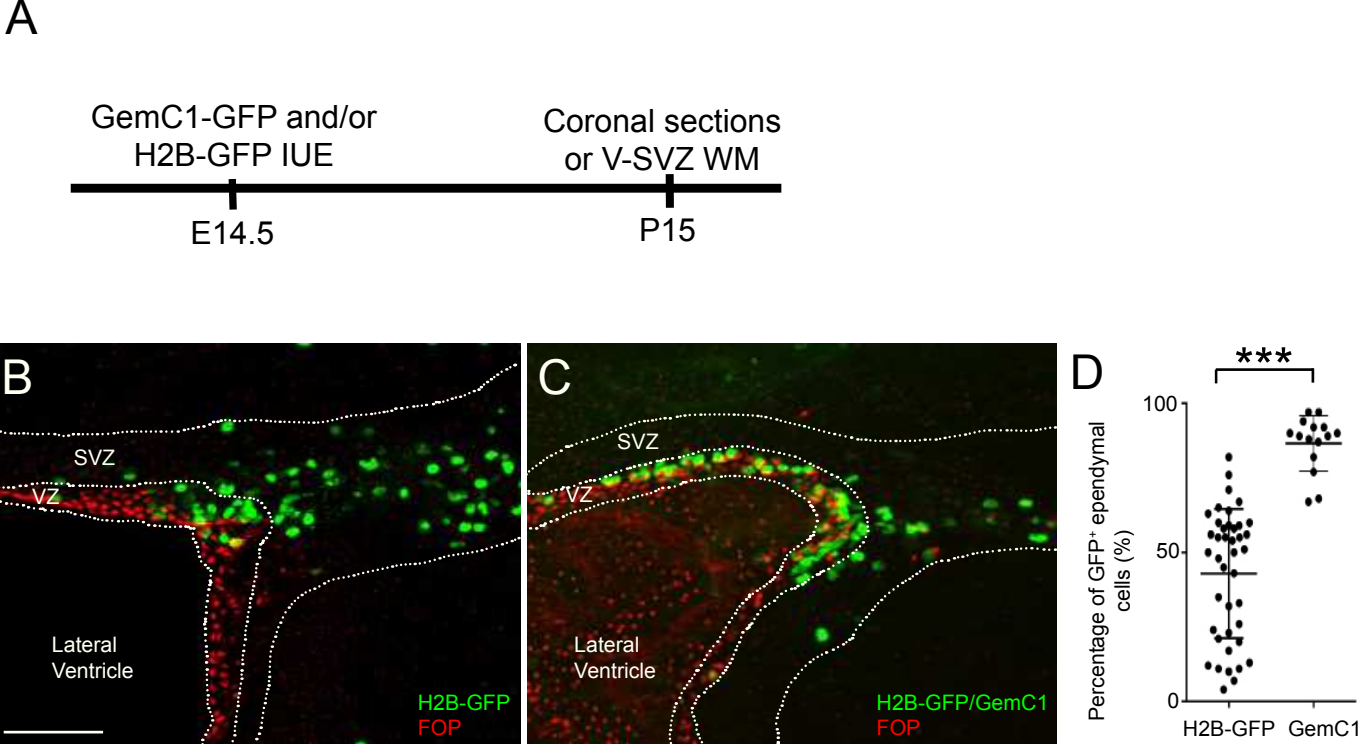


Table S1: MADM lineage tracing after Cre expression at E13.5 or E14.5 (related to Figure 4)

E13.5 Cre				
Clone ID	Clone Size	Composition of clones		Clone type
		Green cell	Red cell	
1B-3	1	B		B
1C-3	1	B		B
1C-1	1	E		E
1A-5	2	E	B	M
3A-2	2	E	B	M
1C-6	2	B	E	M
1A-7	3	B	EE	M
1B-4	3	E	BB	M
1A-3	3	EE	B	M
1B-7	3	B	EE	M
1B-8	3	EB	E	M
3A-1	3	EB	E	M
1A-6	3	E	EE	E
1B-9	3	E	EE	E
5B-1	4	EE	BB	M
1A-11	4	E	EBB	M
1C-4	4	B	EEB	M
1C-5	4	EB	BB	M
3A-3	4	EBB	E	M
1B-2	4	EEB	B	M
3A-4	4	E	BBB	M
1A-8	4	EE	EE	E
1B-5	4	EEE	E	E
1A-4	5	EEEEB	E	M
1A-12	5	EEEEB	E	M
1C-2	5	EEB	EE	M
3B-3	5	EB	EEB	M
1B-6	5	BBB	EE	M
3B-2	6	EEBB	EE	M
1A-10	6	EEEEB	E	M
1A-9	7	EEEEB	EE	M
1B-1	7	EEB	EBBB	M

E14.5 Cre				
Clone ID	Clone Size	Composition of clones		Clone type
		Green cell	Red cell	
19B-1	1		E	E
23B-4	1		E	E
15C-1	1		E	E
6B-1	2	E	B	M
14A-2	2	B	E	M
10B-3	2	B	E	M
13A-2	2	E	B	M
13B-1	2	E	B	M
15B-1	2	E	B	M
15C-2	2	E	B	M
15C-3	2	B	E	M
15C-4	2	E	B	M
22C-1	2	B	E	M
23B-2	2	B	E	M
9B-1	2	E	E	E
9B-3	2	E	E	E
12B-1	2	E	E	E
13A-1	2	E	E	E
14A-1	2	E	E	E
14A-4	2	E	E	E
14A-5	2	E	E	E
14A-6	2	E	E	E
19A-2	2	E	E	E
23B-1	2	E	E	E
8B-4	3	B	BE	M
12A-1	3	B	BE	M
12C-1	3	EB	E	M
14A-7	3	EE	B	M
19A-1	3	B	EE	M
23B-3	3	B	EE	M
15B-2	3	BB	E	M
15B-8	3	EB	E	M
19B-2	3	EB	E	M
14A-3	3	E	EE	E
15B-4	3	E	EE	E
10B-1	4	BB	EB	M
10B-2	4	BB	EE	M
15B-5	4	EB	EE	M
12C-2	4	EE	EE	E
12C-4	4	EE	EE	E
15B-7	5	EBB	EB	M
9B-2	5	EEE	EE	E
15B-6	5	EEE	EE	E
6B-2	6	EEE	EEB	M
12C-3	6	EEEE	EE	E
15B-9	6	EEEE	EE	E
6B-3	6	EEE	EEE	E

Table S2: MADM lineage tracing after GemC1 and Cre expression at E13.5 and E14.5 (related to Figure 5)

E13.5 Cre GemC1				
Clone ID	Clone Size	Composition of clones		Clone type
		Green cell	Red cell	
21B-5	1		E	E
21B-6	1	E		E
21B-7	1	E		E
21B-2	2	E	B	M
21B-3	2	B	E	M
21C-5	2	B	E	M
22A-2	2	B	E	M
21A-4	2	E	E	E
22A-1	2	E	E	E
21B-4	2	E	E	E
21C-2	2	E	E	E
21C-6	2	E	E	E
22A-3	2	E	E	E
21C-1	3	E	EB	M
21A-1	3	E	EE	E
21A-5	3	EE	E	E
21C-3	3	EE	E	E
21C-4	3	E	EE	E
21A-2	4	EEB	E	M
21B-1	4	EB	EB	M
21A-6	4	EEE	E	E
21A-7	4	EE	EE	E
21A-3	5	EE	EEEE	E

E14.5 Cre GemC1				
Clone ID	Clone Size	Composition of clones		Clone type
		Green cell	Red cell	
25C-1	1		E	E
25C-2	1		E	E
25A-3	1	E		E
25A-6	1	E		E
25C-3	2	B	E	M
25A-10	2	E	B	M
28A-7	2	E	B	M
25A-2	2	E	E	E
25A-5	2	E	E	E
25A-7	2	E	E	E
25A-8	2	E	E	E
25A-9	2	E	E	E
26B-2	2	E	E	E
26B-3	2	E	E	E
26B-3'	2	E	E	E
27A-1	2	E	E	E
28A-1	2	E	E	E
28A-2	2	E	E	E
28A-3	2	E	E	E
28A-4	2	E	E	E
28B-1	2	E	E	E
29A-1	2	E	E	E
29A-5	2	E	E	E
29B-1	2	E	E	E
29B-3	2	E	E	E
29B-5	2	E	E	E
25C-4	3	EB	B	M
26B-3"	3	E	EB	M
26A-3	3	B	EE	M
26B-4	5	EEEB	E	M
25A-4	3	EE	E	E
25A-6	3	EE	E	E
26A-1	3	E	EE	E
28A-6	3	E	EE	E
29A-3	3	E	EE	E
29A-4	3	EE	E	E
29A-6	3	E	EE	E
29B-4	3	EE	E	E
29A-2	3	E	EE	E
27A-2	4	EE	EE	E
28A-5	4	EEE	E	E
29A-7	4	EE	EE	E
29B-2	4	EEE	E	E
26A-2	4	EE	EE	E
26B-1	5	EE	EEE	E

Table S3: MADM lineage tracing after Geminin and Cre expression at E14.5 (related to Figure 6)

E14.5 Cre Geminin

Clone ID	Clone Size	Composition of clones		Clone type
		Green cell	Red cell	
341-1-2	1		B	B
360-1-2	1	B		B
362-5-17	1	E		E
362-5-17'	1		E	E
362-5-15	1		E	E
376-4-21	1		B	B
378-4-3	1		B	B
378-4-7	1	E		E
378-4-9	1	E		E
378-5-3	1		E	E
378-3-	1		E	E
378-3-	1		E	E
378-3-	1		E	E
378-3-	1		E	E
378-3-	1		E	E
378-3-	1		E	E
378-3-	1		E	E
378-3-	1		E	E
378-3-	1		E	E
378-3-	1		B	B
378-3-	1		B	B
378-3-	1		B	B
378-3-	1		B	B
378-3-	1		B	B
378-3-	1		B	B
378-3-	1	B		B
378-3-	1	B		B
378-3-	1	B		B
378-3-	1	B		B
378-3-	1	B		B
378-3-	1	B		B
335-1-2	2	B	B	B
376-4-19	2	B	B	B
376-4-25	2	B	B	B
376-5-8	2	B	B	B
376-5-12	2	B	B	B
376-6-4	2	B	B	B
378-3-8	2	B	B	B
378-4-2	2	B	B	B
378-4-8	2	B	B	B
378-4-26	2	B	B	B
360-1-1	2	E	E	E
376-4-4	2	E	E	E
376-4-8	2	E	E	E
376-4-9	2	E	E	E
376-4-11	2	E	E	E
376-4-12	2	E	E	E
376-5-2	2	E	E	E
376-5-10	2	E	E	E
378-3-1	2	E	E	E
378-3-7	2	E	E	E
378-4-5	2	E	E	E
378-4-11	2	E	E	E
378-4-13	2	E	E	E
341-3-2	2	B	E	M
359-2-2	2	E	B	M
359-1-1	2	B	E	M
360-1-3	2	E	B	M
362-5-1	2	B	E	M
362-5-3	2	E	B	M
362-5-10	2	B	E	M
376-4-13	2	B	E	M
376-4-23	2	B	E	M
376-4-24	2	E	B	M
376-4-28	2	E	B	M
376-5-3	2	B	E	M
376-5-4	2	E	B	M
376-5-9	2	B	E	M
376-6-2	2	E	B	M
378-3-4	2	E	B	M
378-3-6	2	E	B	M
378-4-1	2	E	B	M

Clone ID	Clone Size	Composition of clones		Clone type
		Green cell	Red cell	
378-4-12	2	E	B	M
378-4-16	2	E	B	M
378-4-21	2	E	B	M
378-4-24	2	E	B	M
378-5-2	2	E	B	M
378-5-4	2	B	E	M
359-2-1	3	E	EE	E
362-5-2	3	E	EE	E
360-1-4	3	E	EE	E
376-4-6	3	EE	E	E
376-4-16	3	EE	E	E
376-4-22	3	E	EE	E
376-5-14	3	EE	E	E
376-6-5	3	EE	E	E
378-4-6	3	EE	E	E
362-5-5	3	E	EB	M
335-1-1	3	EE	B	M
376-4-2	3	EE	B	M
376-4-15	3	B	EB	M
376-4-17	3	E	EB	M
376-4-20	3	EB	B	M
376-4-26	3	EB	B	M
376-5-13	3	BB	E	M
376-6-8	3	B	EE	M
378-3-2	3	EB	B	M
378-4-4	3	E	EB	M
378-4-15	3	EE	B	M
376-4-5	4	EE	EE	E
376-4-10	4	EE	EE	E
376-6-6	4	EE	EE	E
376-6-7	4	E	EEE	E
378-4-18	4	EE	EE	E
378-4-25	4	EE	EE	E
362-5-14	4	EE	EE	E
376-5-1	4	EB	EE	M
376-5-5	4	BEE	B	M
376-5-11	4	E	EEB	M
376-4-3	4	E	EEB	M
376-6-1	4	EB	EB	M
378-3-3	4	EB	EB	M
378-3-5	4	EE	BB	M
378-4-14	4	EE	EB	M
378-4-17	4	BB	EE	M
378-4-19	4	EB	EE	M
378-4-22	4	EEB	E	M
378-5-1	4	EE	EB	M
361-6-1	4	EE	EB	M
360-1-5	4	EEB	B	M
362-5-4	4	EE	BB	M
362-5-6	4	BB	EB	M
362-5-7	4	B	EEE	M
362-5-9	4	EBB	B	M
362-5-8	5	EE	EEE	E
362-5-18	5	EEEE	E	E
376-6-3	5	EEE	EE	E
362-5-11	5	EEE	EB	M
362-5-12	5	EEB	EB	M
376-5-6	5	BB	EEE	M
376-5-7	5	BBE	BB	M
376-4-1	5	EB	EBB	M
378-4-20	6	EEE	EEE	E
378-4-10	6	EEB	EEE	M
378-4-23	6	EEB	EBB	M
376-4-18	6	EEEEB	B	M
376-4-18bis	7	EEB	EEEEE	M
376-4-14	7	EEEEB	EE	M

Résumé de la thèse

Les astrocytes représentent une des populations cellulaires les plus nombreuses du cerveau. Ces cellules gliales extrêmement ramifiées y jouent un rôle essentiel, notamment dans le cortex cérébral, où elles forment un réseau tridimensionnel continu tout en présentant une hétérogénéité importante au niveau morphologique, moléculaire et fonctionnel. Afin de déterminer comment le réseau astrocytaire est établi au cours du développement cortical murin, des analyses clonales ont été effectuées grâce à une stratégie de marquage multicolore permettant d'étudier simultanément la descendance de nombreux progéniteurs. Les résultats de ces travaux montrent que les clones d'astrocytes corticaux s'imbriquent avec leurs voisins et présentent une variabilité importante au niveau de leur composition en termes de nombre et sous-types cellulaires, leur organisation et leur dispersion spatiale. Le réseau astrocytaire se développe au cours d'une première phase dynamique de prolifération et de dispersion pendant la première semaine postnatale, suivie par une phase de maturation à l'échelle de la cellule avec augmentation du volume des astrocytes et de la complexité de leur arborisation. Ces travaux montrent par ailleurs la contribution non négligeable de progéniteurs post-nataux au réseau astrocytaire, qui s'ajoute à celle des cellules souches neurales corticales embryonnaires. La grande variabilité du réseau astrocytaire à l'échelle clonale suggère que son développement repose sur des unités clonales plastiques composées de cellules dont l'organisation spatiale et les caractéristiques finales dépendent probablement de leurs interactions avec leur environnement neuronal via des acteurs moléculaires qui restent à caractériser.

Mots clefs : astrocyte, développement, cortex cérébral, lignage, multicolore, Olig2

Abstract

Astrocytes are one of the most numerous cell types in the brain. They consist in ramified glial cells that play essential roles in neural tissue where they form an uninterrupted tridimensional network, while displaying important local heterogeneity in terms of morphology and molecular marker expression. To determine how this network is established during development, multiclonal lineage tracing was performed to analyzed large numbers of astrocyte clones issued from nearby mouse cortical progenitors. Results show that cortical astrocyte clones intermix with their neighbors, display extensive variability in terms of spatial organization, numbers and subtypes of generated cells, and increase in size towards the upper part of the cortex. Furthermore, this organization develops through two stages that comprise a dynamic phase of proliferation accompanied by spatial dispersion, and a maturation phase where morphological complexity and volume increase at the single cell level. Moreover a significant contribution of subependymal postnatal progenitors to the generation of astrocytes, independent of their subtype and location, was uncovered in addition to prenatal delaminating apical progenitors. Thus cortical astrocyte network development appears unsteretyped at the clonal level. This suggests that the construction of this network relies on plastic clonal units issued from non-specified astrocyte progenitors that differentially expand and mature, and whose descendants probably acquire their final characteristics through interactions with their neuronal environment through molecular mechanisms that still need to be defined.

Key words: astrocyte, development, cerebral cortex, lineage, multicolor, Olig2