



HAL
open science

Conséquences de l'activation immunitaire maternelle sur l'activité et la connectivité des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale et rôle de la microglie dans les phénotypes observés

Célia Delhaye

► **To cite this version:**

Célia Delhaye. Conséquences de l'activation immunitaire maternelle sur l'activité et la connectivité des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale et rôle de la microglie dans les phénotypes observés. Biologie moléculaire. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS140 . tel-04153745

HAL Id: tel-04153745

<https://theses.hal.science/tel-04153745v1>

Submitted on 6 Jul 2023

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale 394 : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Institut du Fer à Moulin, U1270

Equipe « Sérotonine, Microglie, Plasticité et Pathologie »

Thèse de doctorat en Neurosciences

**Conséquences de l'activation immunitaire maternelle sur
l'activité et la connectivité des neurones dopaminergiques
de l'aire tegmentale ventrale et rôle de la microglie dans
les phénotypes observés**

Par **Célia Delhaye**

Dirigée par Corentin Le Magueresse

Présentée et soutenue publiquement le 11 avril 2023 à Paris

Devant un jury composé de :

Agnès Nadjar	Professeure des universités	Rapportrice
Olivier Pascual	Chargé de recherche	Rapporteur
Slavica Krantic	Chargée de recherche	Examinatrice
Vivien Chevaleyre	Directeur de recherche	Examinateur
Sabine Lévi	Directrice de recherche	Présidente
Corentin Le Magueresse	Chargé de recherche	Directeur de thèse

Résumé

L'activation immunitaire maternelle (« *Maternal Immune Activation* » ou MIA) au cours de la grossesse est un facteur de risque associé à plusieurs pathologies neurodéveloppementales sévères et fréquentes dont les troubles autistiques et la schizophrénie. La modélisation de la MIA chez le rongeur a montré les liens entre activation immunitaire maternelle et altérations du développement cérébral chez la descendance. En particulier, chez des rats dont la mère a reçu un ARN synthétique (Poly(I:C)) qui mime une attaque virale pendant la gestation, l'activité des neurones dopaminergiques (DA) de l'aire tegmentale ventrale (« *Ventral Tegmental Area* » ou VTA) est diminuée *in vivo*. Cependant les mécanismes responsables de cette modification à long terme de la décharge des neurones DA sont inconnus.

Cette thèse vise à caractériser les altérations des propriétés fonctionnelles des neurones DA de la VTA consécutives à une MIA, et à étudier l'implication de la microglie dans ce processus. La MIA a été induite chez la souris C57Bl/6J par une administration de Poly(I:C) au jour embryonnaire 9 (E9), qui est analogue à la fin du premier ou au début du deuxième trimestre de gestation chez l'humain, une période de sensibilité accrue à la MIA d'après les études épidémiologiques. Nos résultats confirment la diminution globale d'activité des neurones DA de la VTA *in vivo* chez les descendants de mères exposées au Poly(I:C) pendant la gestation (souris MIA), et montrent que les neurones sont moins susceptibles de décharger en « bursts ». En utilisant des techniques de patch-clamp et d'immunohistochimie, nous avons observé que la MIA induit une perte des entrées synaptiques excitatrices vers les neurones DA, et diminue spécifiquement les courants portés par les récepteurs NMDA, en l'absence de modification des entrées inhibitrices. De plus, nous avons constaté que les courants médiés par les canaux HCN et l'excitabilité neuronale intrinsèque sont augmentés dans les neurones DA des souris MIA, ce qui pourrait refléter la mise en place de mécanismes homéostatiques régulant l'excitabilité en réponse à la modulation de la balance excitation/inhibition. Puisqu'au cours du développement postnatal, la microglie participe au raffinement de la connectivité synaptique, nous avons étudié les conséquences de la MIA sur les propriétés de la microglie dans la VTA. Nous n'avons pas constaté de changement significatif de densité de la microglie dans la VTA mais une augmentation significative du volume ainsi que de la complexité et de la longueur des ramifications des cellules microgliales. De plus, bien que le volume des lysosomes exprimant CD68 soit inchangé chez les souris MIA, nous avons observé que les cellules microgliales de

la VTA engloutissent un volume plus important d'éléments présynaptiques identifiés par l'expression de la protéine Bassoon. Comme le système du complément intervient dans l'élagage synaptique dépendant de la microglie, nous avons mesuré l'expression de C1q, la protéine initiatrice de la cascade du complément. Nous avons observé que cette expression est fortement augmentée dans le mésencéphale des souris MIA. Enfin, l'administration au cours des deux premières semaines de vie postnatale de minocycline, une tétracycline qui passe la barrière hémato-encéphalique et module la réactivité microgliale, a permis de normaliser la décharge des cellules DA *in vivo*, ainsi que les entrées synaptiques excitatrices des neurones DA de la VTA *ex vivo*.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la MIA altère durablement l'activité et la connectivité des neurones DA de la VTA en affectant les mécanismes de raffinement synaptique dépendant du complément et de la microglie au cours du développement post-natal.

Mots clés : activation immunitaire maternelle, aire tegmentale ventrale, système dopaminergique, microglie

Abstract

Maternal Immune Activation (MIA) during pregnancy is associated with an increased risk to develop neuropsychiatric disorders including autism spectrum disorders (ASD) and schizophrenia. Animal models have been widely used to study how maternal immune activation (MIA) disrupts normal brain development. One of the most widely used agents to model MIA is polyinosinic-polycytidylic acid (Poly(I:C)), a double-stranded synthetic RNA which can be injected to pregnant dams to mimic a viral infection. In particular, adult rats whose mother received (Poly(I:C)) during gestation show decreased activity *in vivo* of dopaminergic neurons (DA) in the Ventral Tegmental Area (VTA). However, the mechanisms responsible for this long-term modification of DA neuron discharge are unknown.

This PhD thesis project aims to characterize the alterations of the functional properties of DA neurons in the VTA following MIA, and to study the role of microglia in this process. MIA was induced in C57Bl/6J mice by Poly(I:C) administration at embryonic day 9 (E9), which is analogous to the end of the first or beginning of the second trimester of gestation in humans, a period of increased susceptibility to MIA according to epidemiological studies. Our results confirm the decreased activity of VTA DA neurons in MIA offspring *in vivo*, and show that DA neurons are less likely to discharge in "bursts." Using patch-clamp and immunohistochemistry techniques, we observed that MIA diminishes excitatory synaptic inputs to DA neurons, and specifically decreases NMDA receptor-mediated currents, in the absence of changes in inhibitory inputs. Furthermore, we found that HCN channel-mediated currents and intrinsic neuronal excitability are increased in DA neurons of MIA offspring, which may reflect homeostatic mechanisms regulating excitability in response to modulation of the excitation/inhibition balance. Since microglia are involved in synaptic pruning during brain development, we investigated whether microglial properties and functions are altered by MIA. We found no significant change in microglia density in the VTA but a significant increase in volume as well as complexity and length of microglial cell branching. Furthermore, although the volume of CD68-expressing lysosomes was unchanged in MIA offspring, we observed that microglial cells in the VTA engulfed a larger volume of presynaptic elements identified by Bassoon protein expression. Since the complement system is involved in microglia-dependent synaptic pruning, we measured the expression of C1q, the initiator protein of the complement cascade. We observed that C1q expression was increased in the midbrain of MIA offspring. Finally, administration during the first two weeks of postnatal life of minocycline, a tetracycline

that crosses the blood-brain barrier and modulates microglial reactivity, normalized DA cell discharge in vivo, as well as excitatory synaptic inputs to DA neurons in the VTA *ex vivo*.

Taken together, these results suggest that MIA may permanently compromise the activity and connectivity of VTA DA neurons in the offspring by affecting complement- and microglia-dependent synaptic refinement mechanisms occurring during early postnatal development.

Keywords: maternal immune activation, ventral tegmental area, dopaminergic system, microglia

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier les membres du jury. Je remercie Agnès Nadjar et Olivier Pascual d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse en tant que rapportrice et rapporteur. Je remercie Slavica Krantic et Vivien Chevalere d'avoir accepté d'être examinatrice et examinateur de cette thèse, ainsi que Sabine Lévi d'avoir accepté de présider le jury de thèse.

Je remercie mon directeur de thèse, Corentin Le Magueresse. Après une pandémie et un confinement, des changements de projet et des déménagements de bureau, nous y voilà ! Corentin, merci pour ta disponibilité, tes conseils, nos discussions scientifiques (mais pas que !) et la confiance que tu m'as accordée dès le M2 et tout au long de ces années de doctorat. Je t'en suis très reconnaissante, *doktorvater*.

Je tiens également à remercier la direction de l'Institut du Fer-à-Moulin : Jean Antoine Girault, Fiona Francis et Jean-Christophe Poncer de m'avoir permis d'effectuer mon stage de M2 puis mon doctorat au sein de l'IFM.

Je remercie également Fabio Marti et Tinaïg Le Borgne de l'équipe « Neurophysiologie et Comportement » à l'ESPCI pour leur collaboration sur le projet de thèse.

Au sein de l'Institut du Fer-à-Moulin, je souhaite remercier Luc Maroteaux et Anne Roumier. Merci pour votre confiance et votre gentillesse. Luc, j'ai adoré patcher les neurones du raphé ! Anne, la soirée que nous avons faite chez toi et le *Just Dance* resteront inoubliables !

Je veux également remercier l'ensemble des membres de l'équipe (actuels et passés). Catherine, un grand merci pour tous tes conseils et ta gentillesse. Merci d'avoir répondu à toutes mes questions (même les plus improbables) et de m'avoir prêté ta cuillère « magique ». Merci Yaëlle de m'avoir formée aux techniques d'immunohistochimie et de PCR lors de mon arrivée en M2. Mélanie, je te remercie pour tes précieux conseils et ton aide. Merci Giulia d'avoir pris le temps de m'enseigner certaines techniques. Fanny, je n'oublierai pas nos discussions au 3^{ème}, entre coupe et préparation de solutions. Merci Imane pour l'aide que tu m'as apportée en biochimie et ta bienveillance. Amina, petit lutin de l'IFM, merci pour ton soutien et ta gentillesse.

Je remercie chaleureusement Hanaé et Emilie, nos fantastiques stagiaires. Merci Hanaé pour les (nombreuses) PCR et autres manip que tu as pu faire pour moi au cours de tes stages dans l'équipe. Merci pour ta bonne humeur et tes bonnes idées – la séance photo improvisée dans le labo par exemple ! Emilie, merci pour ton aide, ton soutien et d'avoir accepté de m'aider à finaliser ce projet. Je te souhaite plein de neurones parfaitement patchés et des enregistrements sans bruit. Bon courage pour ta thèse ! Je suis certaine que tu vas brillamment relever ce nouveau défi.

Je tiens également à adresser un « grand merci » à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au sein de l'IFM et qui ont participé de près ou de loin à cette thèse. Je pense notamment aux personnels de l'animalerie, de la plateforme d'imagerie, de la laverie et de l'administration. Merci pour votre aide et votre gentillesse à tous. Je souhaite également remercier Aude et Anne H. pour tout ce qu'elles m'ont enseigné. Marika, merci pour ton écoute et tes conseils. Merci Florian pour nos discussions entre deux tirages de pipettes et de m'avoir patiemment écoutée me plaindre lors des journées compliquées au patch. Donia, on a commencé ensemble et voilà que nous finissons (presque) ensemble. Bon courage pour la fin de thèse ! Après ça, on se la planifie enfin cette pause-café ? Maëliiss et Marta, je vous remercie sincèrement pour votre écoute, vos conseils et votre sourire à toute épreuve. Ruiyi, merci pour ta gentillesse et pour la découverte des raviolis chinois, miam. Erwan, merci pour ton soutien et vive la Bretagne !

Dans la vie, il y a des expériences qui soudent à jamais. Vivre son doctorat ensemble en est une. Naya, je te suis infiniment reconnaissante pour tout ce que tu m'as apporté ces 3 dernières années. Petite Célia *will always be there for you*.

Alexia, Claire et Rémi, je me sens extrêmement chanceuse de vous avoir rencontrés il y a maintenant plus de cinq ans. Merci pour votre amitié, votre soutien indéfectible, vos encouragements... Merci, merci et merci !

Antoine, je tiens également à te remercier. Nos petits déjeuners et nos échecs à trouver une piscine ouverte demeureront des temps forts de ces années de doctorat.

Je souhaite également remercier Lucile et Berlioz d'avoir été des colocs (presque) parfaits. Je remercie très sincèrement Fabien et Louise qui ont toujours compris mes

indisponibilités, mon emploi du temps de ministre et n'ont cessé de me soutenir. Lorina, merci de ne pas avoir hésité une seule seconde avant d'accepter ce voyage en Islande. Après des années à y penser, notre rêve est devenu réalité ! En début de 3^{ème} année, cette aventure m'a permis de recharger les batteries et d'envisager la fin de thèse plus sereinement.

Mille mercis les ami-e-s !

Je ne peux finir sans te remercier, Matthieu. Merci pour tout.

Et puis, je remercie du fond du cœur ma famille, tout particulièrement mes parents, ma sœur et mes grand-mères. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir toujours soutenue. Malgré les 500 kilomètres qui nous séparent, votre soutien et votre amour me sont toujours parvenus.

Table des matières

LISTE DES FIGURES.....	13
LISTE DES TABLEAUX	17
LISTE DES ABREVIATIONS	19
INTRODUCTION GENERALE.....	23
I. L'aire tegmentale ventrale et le système dopaminergique	25
1. L'aire tegmentale ventrale, développement et neuroanatomie.....	25
1) Développement embryonnaire	25
2) Origine et migration des neurones dopaminergiques de la VTA	26
i. Génération des précurseurs neuronaux	26
ii. Migration et acquisition d'un phénotype mature.....	28
3) Structure et composition cellulaire de la VTA	29
i. La VTA, un ensemble plus qu'une entité structurale.....	29
ii. Diversité cellulaire des neurones dopaminergiques de la VTA	31
iii. Hétérogénéité cellulaire et neurotransmetteurs	32
2. L'aire tegmentale ventrale, au cœur d'un réseau neuronal complexe.....	35
1) La dopamine comme neurotransmetteur	35
i. Synthèse de la dopamine	35
ii. Libération axonale et somatodendritique	36
iii. Les récepteurs dopaminergiques.....	37
iv. Cibles des projections dopaminergiques	39
v. Récupération et dégradation	42
2) Principales entrées synaptiques sur les neurones dopaminergiques de la VTA	
.....	42
i. Le cortex préfrontal.....	42
ii. Les noyaux tegmentaux pédonculopontin et latérodorsal	43
iii. Le nucleus accumbens	43
iv. Le pallidum ventral.....	44
v. Le noyau du lit de la stria terminalis	44

vi.	L'hypothalamus latéral	45
vii.	L'habenula latérale.....	45
viii.	Le noyau tegmental rostromédial.....	46
ix.	Le noyau du raphé dorsal.....	46
x.	L'aire tegmentale ventrale	46
3)	Le système de récompense	47
3.	L'activité des neurones dopaminergiques de la VTA et ses régulateurs.....	48
1)	Signatures électrophysiologiques des neurones dopaminergiques de la VTA	48
2)	Régulateurs de l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA.....	50
i.	Modulations par les signalisations excitatrices et inhibitrices	51
ii.	Modes de régulations intrinsèques	52
II.	La microglie, les macrophages résidents du système nerveux central	55
1.	Aspects historiques de l'étude de la microglie	55
2.	Origine embryonnaire et colonisation du système nerveux central	56
1)	Une origine mésodermale.....	56
2)	Du sac vitellin au cerveau adulte.....	58
i.	Migration du sac vitellin au SNC en développement.....	58
ii.	Entrée au sein du SNC en développement	59
iii.	Dispersion au sein du SNC en développement.....	60
iv.	Différenciation, prolifération et maturation.....	62
3)	Distribution au sein du système nerveux central.....	64
i.	Au cours du développement.....	65
ii.	Dans le cerveau adulte.....	66
4)	Renouvellement au cours de la vie.....	67
i.	En conditions physiologiques.....	67
ii.	En conditions expérimentales, traumatiques et/ou pathologiques.....	68
3.	Hétérogénéité des cellules microgliales	69
1)	Profils d'expression caractéristiques de la microglie.....	69
i.	Marqueurs typiques des macrophages, exprimés par la microglie.....	70
ii.	Marqueurs spécifiques à la population microgliale.....	71
iii.	Profils spécifiques à la région cérébrale	72

2) Morphologie et états d'activation : classifications des cellules microgliales	72
i. Classification morphologique	73
ii. Etats d'activation : M1 versus M2	76
3) Régulateurs de l'activité microgliale	78
i. Neurotransmetteurs	78
ii. Récepteurs aux cytokines	81
iii. Autres récepteurs	82
4. La microglie, actrice du développement	85
1) Angiogenèse et maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique	85
2) De la neurogenèse à l'établissement de la distribution cellulaire	86
i. Neurogenèse	86
ii. Migration et distribution cellulaire au sein du SNC	87
iii. Mise en place des projections axonales	88
3) Interactions microglie – synapses	89
i. Synaptogenèse	89
ii. Activité neuronale et modulation synaptique	90
iii. Raffinement synaptique	92

III. L'activation immunitaire maternelle durant la grossesse, un facteur de risque associé à des désordres neuropsychiatriques 96

1. L'activation immunitaire maternelle	96
1) Agents infectieux et mécanismes d'action	97
i. Virus, bactéries et parasites	97
ii. De la mère à l'enfant : quels sont les médiateurs ?	98
2) L'activation immunitaire maternelle, un facteur de risque : l'exemple du virus de la grippe asiatique et de la schizophrénie	101
2. Des désordres neuropsychiatriques associés à l'activation immunitaire maternelle : la schizophrénie et les troubles du spectre autistique	104
1) Données épidémiologiques	104
2) Altérations cognitives, comportementales et cérébrales associées	105
i. Atteintes cognitives et comportementales	105
ii. Altérations du système dopaminergique	106
iii. Altération de la signalisation glutamatergique	108

iv. Anomalies synaptiques	110
v. Neuro-inflammation et atteinte microgliale	112
3. Génération et phénotypes des modèles animaux.....	114
OBJECTIFS DE LA THESE	121
RESULTATS	125
Article. L’activation immunitaire prénatale, via la microglie, altère la connectivité et l’activité <i>in vivo</i> des neurones dopaminergiques de la VTA	127
DISCUSSION GENERALE	179
1. Le modèle murin <i>Drd2-EGP-L10a</i> : les cellules GFP+ forment-elles une sous-population de neurones dopaminergiques ?	182
2. Lien entre microglie et perte de synapses excitatrices fonctionnelles : excès d’élimination synaptique ou défaut de formation des synapses ?	183
3. Phénotypes différenciés au niveau des synapses excitatrices et inhibitrices dans le modèle MIA	186
4. Contribution des astrocytes aux phénotypes observés	188
5. La minocycline dans le traitement des symptômes associés aux troubles neuropsychiatriques	190
BIBLIOGRAPHIE	193
ANNEXES	237
Article A. La sur-expression de la protéine du complément C4 dans le cortex préfrontal chez la souris induit des endophénotypes associés à la schizophrénie	239
Article B. Les interactions et le regroupement des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{2B} régulent l’excitabilité des neurones sérotoninergiques	283

Liste des figures

Figure 1. Schéma représentant les vésicules encéphaliques primaires et secondaires du cerveau embryonnaire des vertébrés.	26
Figure 2. Schéma de signalisations et morphogènes impliqués dans le développement de la VTA (noyau A10) et des précurseurs dopaminergiques au sein du tube neural	27
Figure 3. Signalisations et morphogènes impliqués dans le développement et la maturation des neurones dopaminergiques (DA).....	28
Figure 4. Les noyaux du groupe A10	30
Figure 5. Distribution des cellules dopaminergiques (exprimant la TH) au sein de la VTA exprimant, ou non, VMAT2, DAT et DRD2	31
Figure 6. Valeurs d'expression moyenne de gènes impliqués dans la synthèse et le transport de la dopamine au sein des 11 clusters définis par Phillips et <i>al.</i> (2022).....	34
Figure 7. Libération axonale de dopamine.	37
Figure 8. Les récepteurs dopaminergiques D ₁ (D ₁ R) activent l'adénylate cyclase (AC) alors que les récepteurs dopaminergiques D ₂ (D ₂ R) l'inhibent.	39
Figure 9. Organisation topographique des cellules TH-positives de la VTA selon la cible de leurs projections axonales.....	39
Figure 10. Schéma des projections des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA) au sein des voies méso-corticale et mésolimbique, sur une coupe sagittale de cerveau de souris.	40
Figure 11. (A) Reconstruction sagittale d'un unique neurone méso-cortico-limbique dopaminergique de la VTA. L'axone principal (trait rouge et gras) atteint le cortex cérébral et	

possède trois collatérales (bleu clair, vert et bleu foncé) qui ciblent des structures limbiques. (B) Dessin schématique des projections et structures innervées par les neurones méso-cortico-limbiques, et (C) par les neurones méso-corticaux, méso-striataux, mésolimbique et ceux ciblant le tronc cérébral. 41

Figure 12. Afférences ciblant les neurones dopaminergiques (gauche) et GABAergiques (droite) de l'aire tegmental ventrale (VTA) 47

Figure 13. Exemples de circuits impliqués dans le système de la récompense..... 48

Figure 14. Exemples de pattern de décharge de neurones dopaminergiques enregistrés chez le rat 49

Figure 15. Exemples de « *voltage sag* » (gauche) et de courants I_h (droite) enregistrés dans des neurones dopaminergiques de la VTA chez le rat. 50

Figure 16. Schéma résumant les principaux récepteurs et canaux régulant l'activité des neurones dopaminergiques (DA) de la VTA..... 54

Figure 17. Dessin de Pío del Rio-Hortega illustrant la distribution de la microglie au sein du cortex cérébral chez le lapin 55

Figure 18. Hématopoïèse primitive et définitive, sources de macrophages tissu-spécifiques.. 57

Figure 19. Les progéniteurs issus du sac vitellin empruntent le système vasculaire afin de rejoindre le cerveau en développement. 59

Figure 20. Dessins schématiques illustrant certains des acteurs et types cellulaires participant à la régulation de la migration des cellules microgliales au sein du SNC en développement 61

Figure 21. Développement embryonnaire et post-natal de la microglie. Plusieurs récepteurs aux cytokines (symboles rouges), facteurs de transcription (symboles noirs) et cytokines (symboles violets) sont nécessaires au développement embryonnaire et post-natal des cellules microgliales.....	64
Figure 22. Images représentatives de la distribution des cellules microgliales (eGFP+) au sein de la VTA chez la souris (CX3CR1 ^{EGFP/+}) à P8, P12, P16, P22 et 2 mois	66
Figure 23. Distribution et morphologie hétérogènes des cellules microgliales au sein des structures cérébrales dans le cerveau murin adulte	66
Figure 24. Dessin de Pío del Rio-Hortega illustrant les différentes morphologies des cellules microgliales chez l’humain	73
Figure 25. Exemple de cellules microgliales sélectionnées comme base de la classification aux travaux de <i>Leyh et al. (2021)</i>	74
Figure 26. Nomenclature passée et présente	78
Figure 27. La microglie (rouge) induit la formation d’un filopode par contact avec la dendrite d’un neurone (vert).....	90
Figure 28. L’élagage synaptique dépendant du système du complément et de la microglie.....	94
Figure 29. L’exposition prénatale à une activation immunitaire maternelle (MIA) augmente la susceptibilité de l’enfant à développer un trouble psychiatrique tel que la schizophrénie ou les troubles du spectre de l’autisme (TSA)	96
Figure 30. La MIA, de la mère à l’enfant	100

Figure 31. Dendrites basilaires imprégnées de Golgi de neurones pyramidaux de la couche 3 du PFC latéro-dorsal d'un sujet contrôle (A) et de deux sujets atteints d'une schizophrénie (B et C)..... 110

Figure 32. Segments de dendrites apicales imprégnés de Golgi provenant de neurones pyramidaux de la couche 5 du cortex frontal d'un patient contrôle (A) et d'un individu atteint d'un TSA (B)..... 111

Figure 33. Dessin schématique de la modélisation d'une exposition prénatale à une MIA chez la souris et ses conséquences sur la cognition et le comportement des descendants exposés 115

Liste des tableaux

Tableau 1. Marqueurs non-spécifiques des cellules microgliales	71
Tableau 2. Classification des états activations selon la nomenclature M0, M1 et M2 (et M3).....	77
Tableau 3. Associations entre pathogènes responsable d'une MIA et schizophrénie ou TSA	97
Tableau 4. Principales études ayant examiné l'association entre exposition <i>in utero</i> à la grippe A (H2N2) et développement d'une schizophrénie.....	103
Tableau 5. Données épidémiologiques concernant la schizophrénie et les TSA.	105
Tableau 6. Résumés des principales altérations cérébrales associées aux cerveaux de patients atteints de schizophrénie ou de TSA.....	113
Tableau 7. Principales altérations physiologiques et comportementales retrouvées chez les modèles MIA obtenus par l'injection de Poly(I:C) à la femelle gestante, dépendamment du stade embryonnaire, de la dose et de la voie d'injection.....	116

Liste des abréviations

AAAD	Acide L-aminé aromatique décarboxylase (= DOPAC)
AC	Adénylate cyclase
aCSF	Artificial cerebro-spinal fluid
AIF-1	Facteur inflammatoire d'allogreffe 1 (= Iba1)
ALDH1A1	Aldéhyde déshydrogénase 1 de type H1
AMPA _R	Récepteur AMPA
AMP _c	Adénosine monophosphate cyclique
AP	Potentiel d'action / action potential
A-P	Axe antéro-postérieur
ARC	Activity-regulated cytoskeleton-associated protein
ARN	Acide ribonucléique
ARN _m	Acide désoxyribonucléique
ASD	Autism Spectrum Disorders
ATP	Adénosine triphosphate
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BLA	Amygdale basolatérale
BMP	Bone morphogenetic protein / protéine osseuse morphogénique
BSA	Bovine-albumine serum
BST	Noyau du lit de la stria terminalis (= BNST)
C1q	Protéine initiatrice de la cascade du complément
C1qR	Récepteur de C1q
C2	Protéine du complément 2
C3	Protéine du complément 3
C3a	Anaphylatoxine / produit du clivage de C3
C3b	Protéine du complément 3b / produit du clivage de C3
C4	Protéine du complément 4
CD11b	Intégrine / sous-unité de CR3
CD45	Cluster de différenciation 45
CD68	Cluster de différenciation 68
CLi	Noyau caudé linéaire
CMP	Cellule myéloïde progénitrice
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CR3	Récepteur du complément 3
CSF-1 _R	Récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase CSF-1
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CX3CL1	Chimiokine ligand C-X3-C1
CX3CR1	Récepteur de CX3CL1 / récepteur fractalkine
CXCL12	Chimiokine de type CXC 12
CXCR4/7	Récepteurs de CXCL12
D _{2L}	Isoforme long des D _{2R}

D ₂ R	Récepteur à la dopamine 2
D _{2s}	Isoforme court des D ₂ R
DA	Dopaminergique
DAMPs	Dommages moléculaires associés à des pathogènes
DAMs	Cellules microgliales associées aux pathologies
D-APV	Acide (±)2-amino,5-phosphonopentanoïque
DAT	Transporteur à la dopamine
DOPAC	DOPA-décarboxylase (= AAAD)
DRN	Noyau du raphé dorsal
dsRNA	ARN double-brin
D-V	Axe dorso-ventral
E	Jour embryonnaire
eEPSCs	Evoked excitatory post-synaptic currents
eGFP	enhanced Green-Fluorescent Protein
EMP	Progéniteur érythroblastique
En-1/2	Engrailed Homeodomain Transcription Factors 1/2
F4/80	Adhesion G protein-coupled receptor E1 (= ADGRE1)
FGF8	Fibroblast G-rowth Factor 8 / facteur de croissance des fibroblastes 8
FoxA1/A2	Facteurs de transcriptions Forkhead box A1/2
FP	Floor plate / plaque plancher
GABA	Acide γ-aminobutyrique
GABA _A R	Récepteur GABA _A
GABA _B R	Récepteur GABA _B
GAD1	Enzyme glutamate décarboxylase 1 (= GAD67)
GAD67	Glutamic Acid Decarboxylase 67 (= GAD1)
Gbx2	Gastrulation Brain Homeobox 2
GFP	Green-fluorescent protein / Protéine fluorescente verte
GPCR	Récepteurs couplés aux protéines G
GWAS	Étude d'association pangénomique
HCN	Canaux activés par l'hyperpolarisation et sensibles aux nucléotides cycliques
Hoxb8	Protéine Homéobox Hox-B8
HPC	Hippocampe
Iba1	Molécule adaptatrice de liaison au calcium ionisée 1 (= AIF-1)
iC3b	Fragment protéique de C3b
ICD	Classification médicale internationale des maladies
IF	Noyau inter-fasciculaire
IFN-γ	Interferon-γ
IL-10	Interleukine 10
IL-17a	Interleukine 17a
IL-34	Interleukine 34
IL-6	Interleukine 6
iNOS	Isoforme inductible de l'oxyde nitrique synthase
IPN	Noyau inter-péronculaire

IRF8	Interferon regulatory factor 8
IRMf	Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
L-DOPA	3,4-dihydroxyphénylalanine
LDTg	Noyau tegmental latérodorsal
LH	Hypothalamus latéral
LHb	Habenula latérale
Lmx1 α	LIM homeobox transcription factor 1 α
Lmx1 β	LIM homeobox transcription factor 1 β
LPS	Lippopolysaccharide / glycolipide de la membrane externe des bactéries Gram-négatives
mEPSCs	Miniature excitatory post-synaptic currents
MHB	Midbrain-hindbrain boundary ou isthmus / jointure entre le mésencéphale et le rhombencéphale
MHC	Complexe majeur d'histocompatibilité
MIA	Maternal Immune Activation / Activation Immunitaire Maternelle
mIPSCs	Miniature inhibitory post-synaptic currents
MMP	Métalloprotéinases matricielles
mPFC	Cortex préfrontal médian
MPTP	Agent utilisé pour modéliser la maladie de Parkinson
MSN	Medium-spiny neurons / cellules GABAergiques de taille moyenne du striatum
Myb	Facteur de transcription
MZ	Zone marginale
NAcc	Nucleus accumbens / partie ventrale du striatum
NMDA _R	Récepteur NMDA
NO	Monoxyde d'azote
Otx2	Protein orthodenticle homolog 2
P	Jour postnatal
P2RY12	Récepteur purinergique P2Y12
PAMPs	Patterns moléculaires associés à des pathogènes
PANX1	Pannexine 1
PaP	Noyau para-pédonculaire
PBP	Noyau pigmentaire para-brachial
PBS	Phosphate Buffered Saline
PET	Tomographie par émissions de positons
PFC	Cortex préfrontal
Pitx3	Paired-like homeobox protein
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PKM	Fragment protéolytique de la PKC
PN	Noyau para-nigral
Poly(I:C)	Acide polyinosinique-polycytidylique
PPR	Paired Pulse Ratio
PPTg	Noyau tegmental pédonculaire
PS	Phosphatidylsérine

PSD-95	Protéine postsynaptic density 95
PU.1	Facteur de transcription
PV	Parvalbumine
RLi	Noyau linéaire rostral du raphé
RMTg	Noyau tegmental rostromédial
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RP	Roof plate / plaque toit
RRF	Retrorubral field / aire rétrorubrale
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
SHH	Protéine Sonic Hedgehog
SHP	Filopode s'établissant sur le sommet d'une épine dendritique par contact de la microglie
shRNA	Petit ARN en épingle à cheveux
SN	Substance noire
SNC	Système nerveux central
SNpc	Substance noire pars compacta
SNr	Substance noire reticulata
spf	Semaine post-fécondation
SST	Somatostatine
SVZ	Zone sous-ventriculaire
TH	Tyrosine Hydroxylase
Th17	Lymphocyte T helper 17
TLR	Récepteur <i>Toll-Like</i>
TMEM119	Protéine transmembranaire
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale
TPH2	Tryptophane hydroxylase 2
TREM2	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
TSA	Trouble du spectre de l'autisme
TSPO	18kDa Translocator protein
TTX	Tétradotoxine
tVTA	Tail of the VTA / partie caudale de la VTA (= VTAC)
VGAT	Transporteur vésiculaire au GABA (= VIAAT)
VGLUT 3	Transporteur vésiculaire au glutamate 3
VGLUT1	Transporteur vésiculaire au glutamate 1
VGLUT2	Transporteur vésiculaire au glutamate 2
VIAAT	Transporteur d'acides aminés inhibiteurs vésiculaires (= VGAT)
VMAT2	Transporteur vésiculaire des monoamines (SLC18A2)
VP	Pallidum ventral
VTA	Ventral tegmental area / aire tegmentale ventrale
VTAC	Partie caudale de la VTA (= tVTA)
VTAR	Partie rostrale de la VTA
VZ	Ventricular zone / zone ventriculaire
Wnt1	Wnt family member 1

Introduction générale

I. L'aire tegmentale ventrale et le système dopaminergique

Les neurones dopaminergiques (DA) sont présents, pour leur plus grande part, dans deux régions cérébrales : l'aire tegmentale ventrale (*Ventral Tegmental Area* ou VTA) et la substance noire *pars compacta* (SNpc). Chez les mammifères, la VTA se situe dans le mésencéphale, aussi appelé cerveau moyen (« *midbrain* » en anglais). Elle fait partie du système de la récompense et est impliquée dans de nombreuses fonctions cognitives complexes, notamment la prise de décision, la mémoire de travail ou encore les renforcements positifs et négatifs. Au cœur d'un réseau neuronal complexe, les neurones DA de la VTA reçoivent des afférences de diverses régions et envoient des projections axonales vers le cortex, le striatum ventral (nucleus accumbens, NAcc) et l'amygdale, formant les voies méso-corticale et mésolimbique. Des altérations de ces voies sont associées à plusieurs pathologies neurologiques et neuropsychiatriques majeures, comme la schizophrénie ou les addictions, ce qui reflète leur importance fonctionnelle.

1. L'aire tegmentale ventrale, développement et neuroanatomie

1) Développement embryonnaire

Lors du développement embryonnaire, la neurulation a lieu à 3 semaines post-fécondation (spf) chez l'humain et à E8.5 chez la souris (Copp, 2005). Lors de cette étape, le tube neural, qui va générer le futur système nerveux central (SNC), se forme. Chez la souris, le tube neural se ferme entre E8.5 et E10 (Gofflot et al., 1997). La partie rostrale du tube neural vient former l'encéphale tandis que la partie caudale devient la moelle épinière. Par définition, l'encéphale est l'ensemble des structures présentes dans la boîte crânienne. A 4 spf chez l'humain et vers E10 chez la souris, l'encéphale se développe formant trois vésicules encéphaliques primitives : (1) le prosencéphale (« *forebrain* » en anglais), (2) le mésencéphale (« *midbrain* »), et (3) le rhombencéphale (« *hindbrain* ») (Wang et al., 2020) (Figure 1). C'est au sein du mésencéphale, également appelé cerveau médian ou moyen (« *midbrain* » en anglais), que se trouve la VTA.

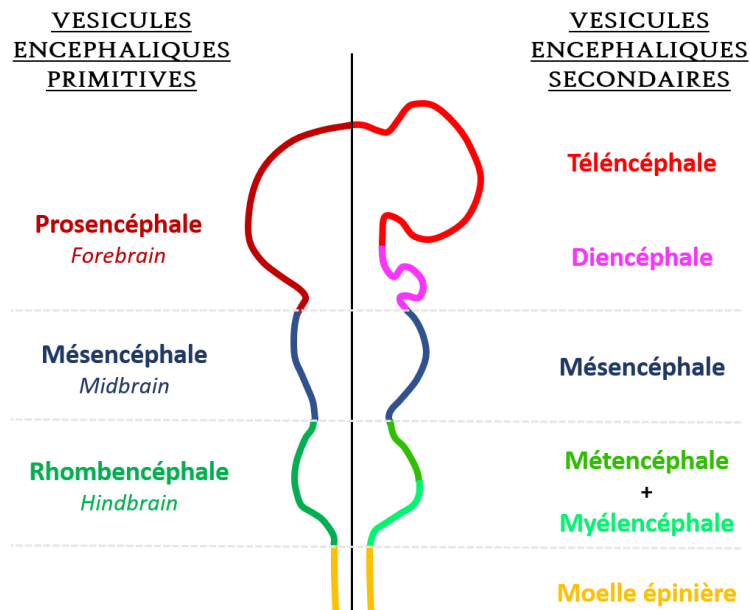


Figure 1. Schéma représentant les vésicules encéphaliques primaires et secondaires du cerveau embryonnaire des vertébrés.

Source : (Rice' and Jr, 2000)

Et adaptée de Par I, Nrets, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2527541>

2) Origine et migration des neurones dopaminergiques de la VTA

In vivo, dès la neurulation, plusieurs mécanismes et voies de signalisation se mettent en place afin de permettre la prolifération des progéniteurs neuronaux, suivie de la migration et de la différenciation des précurseurs neuronaux en neurones DA. Pour finir, ces neurones s'insèrent dans un réseau neuronal en établissant des synapses et en projetant leur axone vers leur cible.

i. Génération des précurseurs neuronaux

Le tube neural peut être décrit selon deux axes : l'axe dorso-ventral (D-V) et l'axe antéro-postérieur (A-P). Des gradients protéiques s'opposent au sein du tube neural afin de créer un environnement propice à la génération de différents progéniteurs neuronaux.

L'axe D-V est défini par deux sous domaines du tube neural : la partie dorsale appelée plaque toit (« *roof plate* », RP) et la partie ventrale nommée plaque plancher (« *floor plate* », FP). Alors que la plaque toit sécrète la protéine osseuse morphogénique (« *bone morphogenetic protein* », BMP), la partie ventrale produit la protéine *Sonic Hedgehog* (SHH). L'implication de BMP dans la neurulation est conservée chez les vertébrés et non-vertébrés (Bond et al.,

2012). Des exemples d'étude chez le xénope (Lamb et al., 1993), chez la drosophile (Holley et al., 1996, 1995) et également chez la souris (Ybot-Gonzalez et al., 2007) ont montré que l'inhibition de la signalisation BMP confère au neuroectoderme son destin neuronal. L'expression de SHH par la plaque *plancher* permet le maintien du gradient en ventral de la structure malgré l'éloignement de la notochorde et ainsi de générer l'expression d'autres gènes localement (Verney et al., 2001 ; Ye et al., 1998) (Figure 2).

Sur l'axe A-P, l'acide rétinoïque (« *retinoic acid* ») et la signalisation Wnt1 (« *Wnt family member 1* ») sont en charge de définir la partie postérieure/caudale de l'embryon (Prakash et al., 2006). La jointure entre le mésencéphale et le rhombencéphale (« *Midbrain-Hindbrain Boundary* », MHB ; aussi appelé « *isthmus* »), joue un rôle fondamental. Cette région exprime deux facteurs de transcription essentiels : la protéine Otx2 (« *Orthodenticle Homolog 2* ») dans le mésencéphale et la protéine Gbx2 (« *Gastrulation Brain Homeobox 2* ») dans le rhombencéphale, qui répriment leur transcription mutuelle au niveau de la MHB (Abeliovich and Hammond, 2007 ; Wang et al., 2020). C'est au niveau ventral de la MHB, dans la zone ventriculaire (VZ), que l'expression conjointe du facteur de croissance des fibroblastes 8 (« *Fibroblast G-rowth Factor 8* », Fgf8) et de celle de SHH permettent aux précurseurs neuronaux dopaminergiques de voir le jour (Ye et al., 1998) (Figure 2).

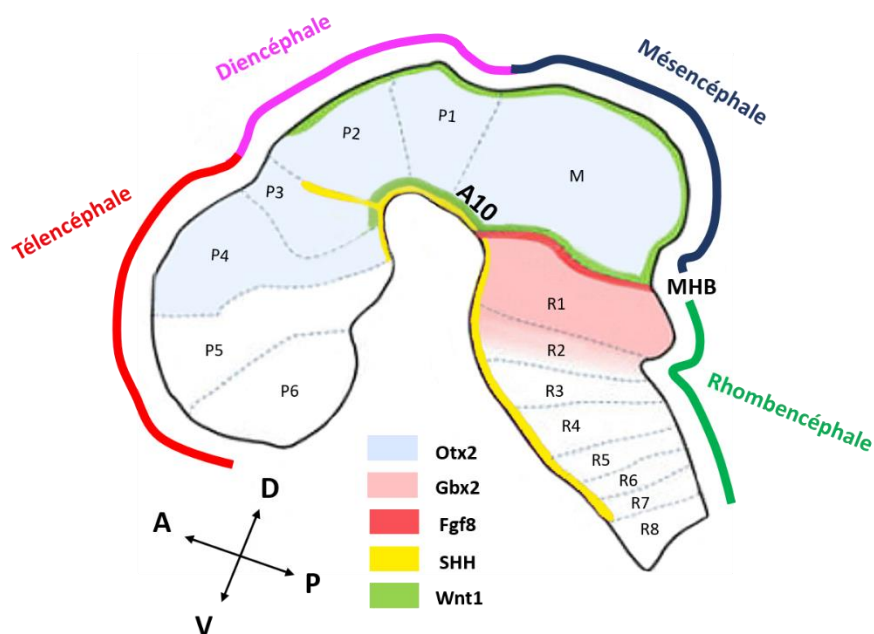


Figure 2. Schéma de signalisations et morphogènes impliqués dans le développement des précurseurs dopaminergiques de la VTA (noyau A10) au sein du tube neural ; MHB : jointure entre le mésencéphale et le rhombencéphale ; A↔P : axe antéro-postérieur ; D↔V : axe dorso-ventral ; P1-P6 : protomères ; R1-R8 : rhombomères.

Adaptée de Wang et al. (2020)

ii. *Migration et acquisition d'un phénotype mature*

Entre E10 et E14, les destins cellulaires des neurones DA se définissent graduellement (Hegarty et al., 2013). La sortie d'un stade mitotique vers un statut post-mitotique et la maturation des cellules dépendent de plusieurs facteurs développementaux : les facteurs de transcriptions FoxA1/A2 (« *Forkhead box A1/2* »), Lmx1 α et Lmx1 β (« *LIM homeobox transcription factor 1 α/β* »), Nurr1 (« *Orphan Nuclear Receptor 1* »), Pitx3 (« *Paired-like Homeobox Protein* ») et En-1/2 (« *Engrailed Homeodomain Transcription Factors 1/2* ») (Andersson et al., 2006 ; Bissonette and Roesch, 2016 ; Kim et al., 2003 ; Ono et al., 2007 ; Saucedo-Cardenas et al., 1998 ; Verney et al., 2001; Wang et al., 2020) (Figure 3). Vers E11.5 chez la souris et entre 5 à 8 spf chez l'humain, ces facteurs coopèrent afin de réguler la prolifération et la maturation des futurs neurones DA (Andersson et al., 2006 ; Nelander et al., 2009). Un profil d'expression génique unique aux neurones DA comprend tous ces facteurs de transcription. Les neurones DA nouvellement générés, encore immatures, acquièrent l'expression de facteurs nécessaires à leur fonction au cours de leur migration. Partant de la VZ, ils migrent en deux phases : (1) d'abord ventralement/radialement en utilisant la glie radiaire, puis (2) latéralement/tangentiellement jusqu'à atteindre leur position finale (Kawano et al., 1995). La tyrosine hydroxylase (TH), l'enzyme limitante de la synthèse de la dopamine, fait partie des protéines spécifiquement exprimées par les neurones DA.

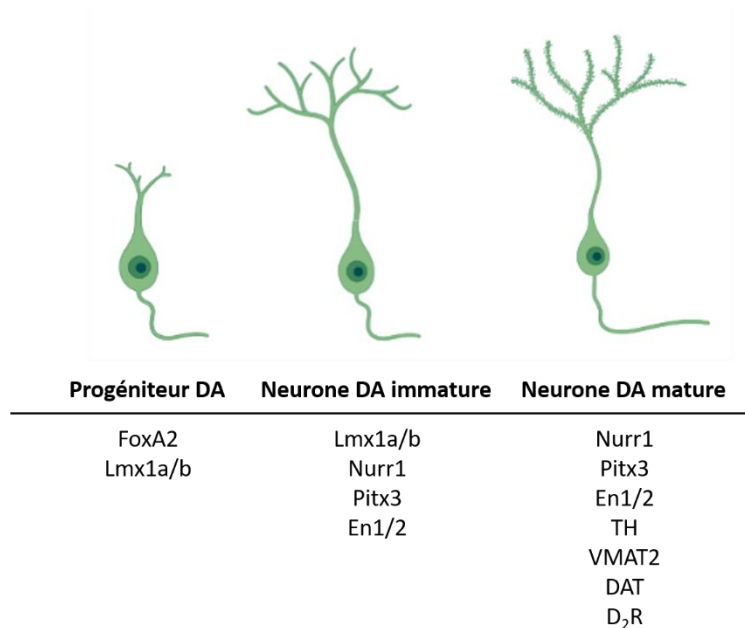


Figure 3. Signalisations et morphogènes impliqués dans le développement et la maturation des neurones dopaminergiques (DA)

Adaptée de Wang et al. (2020)

L'induction de l'expression de TH est une marque d'un phénotype neuronal mature. Par utilisation conjointe d'un marquage immunocytochimique anti-tyrosine hydroxylase (anti-TH) et de l'autoradiographie à la ^3H -thymidine, Bayer et *al.* ont montré que la neurogenèse des cellules dopaminergiques de la VTA chez la souris commence à E10 et se termine à E14, avec un pic de neurogenèse observé entre E12 et E13 (Bayer et al., 1995). Chez le fœtus humain, l'apparition d'un marquage immunohistochimique anti-TH dans des neurones a été observé dès 6 spf (Nelander et al., 2009). Ainsi, la neurogenèse des neurones DA dans le mésencéphale humain semble avoir lieu à partir de la 6^{ème} spf et connaître un pic entre la 7^{ème} et la 8^{ème} spf (Ásgrímsdóttir and Arenas, 2020 ; Nelander et al., 2009). La maturation des cellules dopaminergiques est également marquée par l'expression de marqueurs synaptiques comme le transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT2/SLC18A2) et celle du transporteur à la dopamine (DAT) qui est exprimé dès 12 spf chez le fœtus humain (Aubert et al., 1997). Un autre marqueur synaptique, le récepteur D₂ à la dopamine (D₂R), qui est un autorécepteur lorsqu'il est exprimé par les neurones DA et qui permet un rétrocontrôle négatif de la synthèse et de la libération de la dopamine, est également détectable par hybridation *in situ* à ce stade développemental chez l'humain (Aubert et al., 1997). Bayer et *al.* estiment que, chez la souris, les neurones DA pourraient avoir fini leur migration depuis le ventricule et leur maturation à E16 (Bayer et al., 1995). Enfin, la VTA peut être identifiée dès E15 chez la souris (Kim et al., 2020).

Trois groupes de neurones DA émergent du mésencéphale : les groupes A8, A9 et A10. Le groupe A8 est un petit groupe de neurones retrouvés dans l'aire rétrorubrale (« *retrosubstantia nigra* », RRF). Les neurones DA de la SNc forme le groupe A9 tandis que ceux de la VTA sont le groupe A10 (Abeliovich and Hammond, 2007 ; German and Manaye, 1993 ; Prakash and Wurst, 2006).

3) Structure et composition cellulaire de la VTA

i. La VTA, un ensemble plus qu'une entité structurelle

La VTA se situe sur le plancher du mésencéphale. Sa structure n'est délimitée que par les régions cérébrales qui l'entourent ; notamment, par la SNc au niveau ventrolatéral et le noyau

tegmental rostromédial (RMTg ; parfois considéré comme la « *tail of the VTA* », tVTA) au niveau caudal.

Finalement, les neurones DA du A10 sont le regroupement, sous le nom de VTA, de plusieurs populations de neurones DA issus du plancher mésencéphalique. Selon les études, plusieurs noyaux sont ainsi définis : (1) le noyau pigmentaire para-brachial (PBP), (2) le noyau para-nigral (PN), (3) le noyau caudé linéaire (CLi), (4) le noyau inter-fasciculaire (IF) et (5) le noyau linéaire rostral du raphé (RLi) (Morales and Margolis, 2017) (Figure 4). Dans certains travaux, RLi, CLi et IF peuvent être regroupés sous le nom de « noyaux médians de la VTA ». De la même manière, PBP et PN peuvent être considérés, ensemble, comme la partie latérale de la VTA (Morales and Margolis, 2017). Il est d'autant plus complexe de définir la VTA comme une entité structurelle qu'il n'y a pas de consensus dans la définition de sa composition. Certaines études mentionnent d'autres noyaux : (6) le noyau para-pédonculaire (PaP) ou inter-pédonculaire (IPN) (Kawano et al., 2006 ; Yamaguchi et al., 2007), (7) le noyau rouge (Kawano et al., 2006 ; Yamaguchi et al., 2007), (8) la partie rostrale de la VTA (VTAR) (Aransay et al., 2015 ; Fu et al., 2012) ou encore (9) la partie caudale de la VTA (VTAC) (Aransay et al., 2015) (résumés par Trutti et al., 2019).

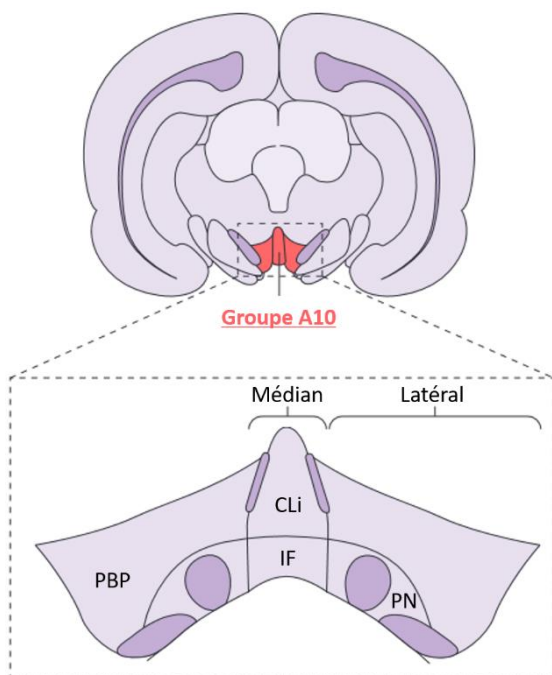


Figure 4. Les noyaux du groupe A10 ; CLi : noyau caudé linéaire ; IF : noyau inter-fasciculaire ; PBP : noyau pigmentaire para-brachial ; PN : noyau para-nigral (RLi : noyau linéaire rostral du raphé, non présent). Adaptée de Morales et Margolis (2017)

ii. *Diversité cellulaire des neurones dopaminergiques de la VTA*

Certains groupes de neurones DA au sein de la VTA se distinguent par l'expression de protéines spécifiques. Le groupe de neurones DA A10 est parmi les 3 clusters – A8, A9 et A10 – celui qui présente une plus grande hétérogénéité des profils de neurones DA (Fu et al., 2012). La calbindin D_{28-k} (« *calcium binding protein* », calbindin) fait partie des protéines permettant de définir plusieurs populations cellulaires au sein de la VTA. Selon Fu et al., le pourcentage de neurones positifs à la calbindin et exprimant TH y fluctue entre 41,1 et 97,3% ; la calbindin est moins exprimée dans la partie latérale de la VTA (Fu et al., 2012). Selon cette même étude, le pourcentage de cellules coexprimant DAT et TH varie entre 7,1 et 95,6% selon les noyaux de la VTA. La calbindin permet non seulement de définir des groupes de neurones DA au sein de la VTA au niveau neurochimique (neurones DA exprimant ou n'exprimant pas la calbindin) (Fu et al., 2012 ; Liang et al., 1996), mais également au niveau électrophysiologique (Neuhoff et al., 2002). De plus, DAT, VMAT2 et l'autorécepteur D₂R sont trois protéines fréquemment exprimées au cours de la maturation

des neurones DA de la VTA (Figure 3), mais certains neurones DA ne les expriment pas. Impliquées dans la signalisation DA, ces protéines s'expriment selon des gradients : leur expression est plus marquée dans la partie latérale de la VTA que dans la partie médiane (Morales and Margolis, 2017) (Figure 5). En particulier, l'expression de l'autorécepteur D₂R pourrait spécifier deux populations de neurones DA en fonction de leur cible : le noyau accumbens (NAcc) (voie mésostriatale) ou le cortex (voie mésocorticale) (Lammel et al., 2008). Les neurones DA de la voie mésostriatale expriment plus l'autorécepteur D₂R que ceux de la

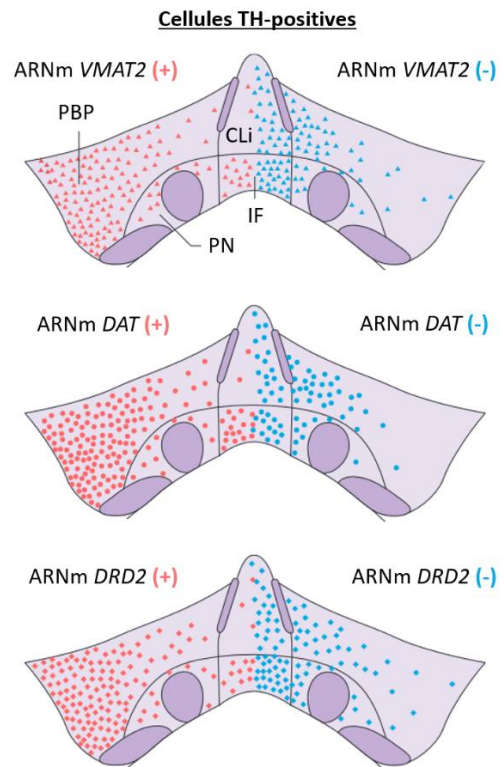


Figure 5. Distribution des cellules dopaminergiques (exprimant la TH) au sein de la VTA exprimant, ou non, VMAT2, DAT et DRD2 ; VMAT2 : transporteur vésiculaire des monoamines 2 ; DAT : transporteur à la dopamine 2 ; DRD2 : récepteur à la dopamine 2 ; CLi : noyau caudé linéaire ; IF : noyau interfasciculaire ; PBP : noyau pigmentaire parabrachial ; PN : noyau paranigral (RLi : noyau linéaire rostral du raphé, non présent). *Adaptée de Morales et Margolis (2017)*

voie mésocorticale – il convient cependant de noter que l’expression de l’auto-récepteur D₂R n’est pas nulle dans ces derniers.

iii. Hétérogénéité cellulaire et neurotransmetteurs

La VTA n’est pas exclusivement composée de neurones DA : ils ne représentent qu’environ ~60 à 70% des neurones. Elle contient également des cellules sécrétant d’autres neurotransmetteurs comme le GABA (~35% des cellules) ou le glutamate (~3% des cellules) (Nair-Roberts et al., 2008 ; Yamaguchi et al., 2007). Parmi ces neurones, certains sont capables de co-transmission (libération de deux neurotransmetteurs différents au niveau du même axone et/ou par la même vésicule) (Morales and Margolis, 2017 ; Stuber et al., 2010 ; Sulzer et al., 1998 ; Tritsch et al., 2012). Ces différentes populations cellulaires ne sont pas spécifiques à certains noyaux de la VTA mais s’organisent en gradient voire de façon diffuse (Morales and Margolis, 2017 ; Trutti et al., 2019). Ci-après sont résumées les transmissions et co-transmissions existantes chez le rongeur :

Les neurones DA de la VTA présentent une grande diversité de profils comme nous l’avons détaillé précédemment. De surcroît, leur position au sein de la structure n’est pas homogène. Au sein de la VTA, les cellules exprimant TH (TH+) sont retrouvées en plus grande densité au sein de l’IF et du CLi, soit dans la zone médiane de la structure. Sur l’axe antéro-postérieur, la plus grande densité en cellules TH+ se trouve au cœur de la région (tiers central) et cette densité diminue en avant et en arrière de la structure (Swanson, 1982). Indépendamment, Yamaguchi et *al.* ont observé une densité de cellules TH+ plus grande au sein du PBP, c’est-à-dire dans la partie latérale de la VTA, qu’au sein de la VTAR (Yamaguchi et al., 2007).

Les neurones GABAergiques (GABA) forment la seconde plus grande population neuronale au sein de la VTA. Ils sont caractérisés par (i) l’expression de l’enzyme glutamate décarboxylase 1 (GAD1 ou GAD67) ou de son isoforme GAD2 (ou GAD65) – qui permettent la synthèse du GABA (Erlander et al., 1991), ainsi que par (ii) l’expression du transporteur vésiculaire au GABA (VGAT, aussi nommé transporteur d’acides aminés inhibiteurs vésiculaires, VIAAT) (Morales and Margolis, 2017 ; Wojcik et al., 2006). Les neurones GABA de la VTA jouent à la fois un rôle local d’interneurones en formant des synapses sur les

dendrites proximales des neurones DA et sur d'autres neurones GABA, ainsi qu'un rôle distal en projetant leur axone vers des structures en dehors de la VTA. Il semble que la population de neurones GABA dans la VTA soit constituée de plusieurs sous-classes de cellules. L'expression de protéines spécifique permet ainsi de définir des types de neurones GABA, et semble corrélée à leur localisation au sein de la VTA (Bouarab et al., 2019). Par exemple, la parvalbumine (PV) est exprimée par un sous-groupe de neurones GABA positionnés dans la partie rostromédiale de la structure (Olson and Nestler, 2007). Une étude récente a également révélé la présence de trois sous-types d'interneurones GABAergiques à somatostatine (SST+) au sein de la VTA chez la souris, notamment identifiables par leurs propriétés électrophysiologiques (Nagaeva et al., 2020).

Les neurones GABA/DA sont des neurones TH+ qui expriment un marqueur de la signalisation GABA et/ou libèrent du GABA. Kim et al. ont montré que 15% des neurones DA de la VTA expriment un isoforme de GAD, et que l'expression de GAD par les neurones DA n'est pas obligatoire pour la co-libération de dopamine et de GABA (Kim et al., 2015). Les neurones DA, grâce à l'expression de l'aldéhyde déshydrogénase 1 de type H1 (ALDH1A1), peuvent synthétiser du GABA (Kim et al., 2015 ; Li et al., 2021). Il est intéressant de noter qu'entre 25 et 37% des cellules TH+ dans la VTA expriment ALDH1A1 (Kim et al., 2015 ; Li et al., 2021 ; Wu et al., 2019).

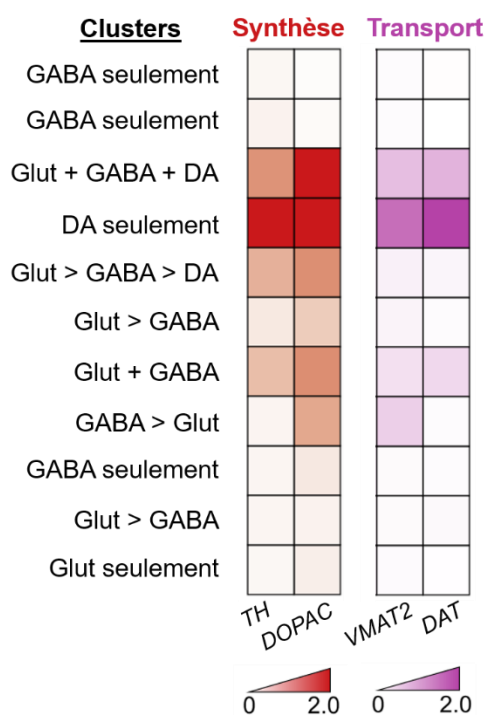
Les neurones glutamatergiques (Glut) représentent une minorité de cellules (~3 %) au sein de la VTA. Ils sont identifiables par la détection de l'ARN du transporteur vésiculaire au glutamate 2 (VGLUT2) et n'expriment pas (ou très faiblement) les deux autres isoformes du transporteur, VGLUT1 et VGLUT3 (Kawano et al., 2006 ; Yamaguchi et al., 2007). Les neurones Glut de la VTA projettent leur axone jusqu'au NAcc ou au PFC, mais peuvent également former des synapses sur d'autres cellules au sein même de la VTA (Kawano et al., 2006 ; Morales and Margolis, 2017). (Cai and Tong, 2022)

Les neurones Glut/DA sont des neurones TH+ qui expriment VGLUT2. Ils représentent ~ 60% des neurones Glut de la VTA (Kawano et al., 2006). Alors qu'ils ne sont pas (ou peu) présents dans le A8 et le A9, les neurones Glut/DA représentent ~ 20% des neurones TH+ de la VTA (Kawano et al., 2006 ; Yamaguchi et al., 2015). Les neurones Glut/DA sont principalement présents dans la zone centrale (au sein de l'IF, du RLi) et dans la

partie rostrale (dans le CLi / dans la VTAR) de la VTA (Kawano et al., 2006 ; Yamaguchi et al., 2011, 2007). On les retrouve donc plutôt dans la région médiane de la VTA. La dopamine et le glutamate semble y être ségrégués dans des vésicules distinctes au sein de microdomaines axonaux distincts (Kawano et al., 2006). Les deux microdomaines axonaux peuvent cibler le même neurone. Lorsqu'une synapse glutamatergique classique, asymétrique, se forme, la dopamine peut participer (ou non) à la synapse, et jouer un rôle de modulateur sur la signalisation excitatrice établie (Morales and Margolis, 2017).

Les neurones GABA/Glut sont des neurones de la VTA qui ne synthétisent pas et ne libèrent pas de dopamine. Cependant, ils expriment des marqueurs associés aux signalisations GABAergique et glutamatergique. La majorité des neurones de la VTA ciblant l'habenula latérale (LHb) présentent une expression conjointe de l'ARN de VGLUT2 et de GAD (Root et al., 2014). La libération conjointe de GABA et de glutamate par le même axone est un moyen de finement contrôler la balance excitation/inhibition locale.

Enfin, des **neurones DA/GABA/Glut** ont été mis en évidence : ces neurones ciblent l'habenula latérale et expriment VGLUT2, GAD, et TH (Root et al., 2014).



Enfin, par une analyse transcriptomique, Phillips et al. ont identifiés 11 clusters neuronaux distincts au sein de la VTA chez le rat, et parmi ces clusters, certains expriment des marqueurs associés à plusieurs neurotransmetteurs (Phillips et al., 2022) (Figure 6).

Figure 6. Valeurs d'expression moyenne de gènes impliqués dans la synthèse et le transport de la dopamine au sein des 11 clusters définis par Phillips et al. (2022). TH : Tyrosine Hydroxylase ; DOPAC : DOPA-décarboxylase ; VMAT2 : transporteur vésiculaire des monoamines 2 ; DAT : transporteur de la dopamine.

Adaptée de Phillips et al. (2022)

Malgré la grande hétérogénéité des populations cellulaires qui la composent, la VTA est considérée dans la plupart des études comme **une région unique**, et dans la suite de ce manuscrit, nous la considérerons comme telle également.

2. L'aire tegmentale ventrale, au cœur d'un réseau neuronal complexe

Les neurones DA de la VTA sont au centre d'un réseau complexe. Recevant de multiples afférences (excitatrices, inhibitrices et modulatrices), ils projettent leur axone dans plusieurs régions cérébrales. Leur activité est directement modulée par l'ensemble des entrées synaptiques qu'ils perçoivent, et l'intégration de ces informations participe au contrôle de la libération de dopamine dans les régions cibles. Les circuits incluant la VTA, ses afférences et ses cibles participent notamment à l'apprentissage, à la récompense et à la punition.

1) La dopamine comme neurotransmetteur

i. Synthèse de la dopamine

En 1957, Carlsson et *al.* identifient la dopamine (3-hydroxytyramine) dans le cerveau (Carlsson et al., 1957). La synthèse de la **dopamine** est permise par une chaîne de réactions enzymatiques. Un acide aminé, la tyrosine, est hydroxylé en 3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) par la TH. La L-DOPA est ensuite convertie en dopamine par la DOPA-décarboxylase (DOPAC, ou acide L-aminé aromatique décarboxylase, AAAD) (Figure 7). La dopamine est détectée dans le mésencéphale dès le stade de développement embryonnaire E13 chez la souris (Golden, 1972). Cette expression précoce suggère que la dopamine contribue au développement cérébral prénatal. De fait, des résultats ultérieurs ont montré notamment le rôle de sa signalisation dans la génération des précurseurs neuronaux corticaux (Zhang, 2004) et son implication dans la différenciation et la migration des interneurons corticaux (Ohira, 2019). La dopamine synthétisée est stockée via le transporteur vésiculaire des monoamines (« *vesicular monoamine transporter 2* », VMAT2) dans des vésicules axonales, en attendant sa libération (Morales and Margolis, 2017 ; Sulzer et al., 2016) (Figure 7). Afin de stocker les monoamines au sein des vésicules, VMAT2 utilise un gradient de protons générés par une V-ATPase. La sortie de protons permet l'entrée de dopamine au sein de la vésicule (Schuldiner et al., 1995 ; Sulzer et al., 2016). Les vésicules sont présentes dans des varicosités synaptiques, à

la fois au niveau présynaptique et au niveau de boutons axonaux de type ‘en-passant’ (Liu et al., 2021 ; Liu and Kaeser, 2019 ; Sulzer et al., 2016) (Figure 7). La dopamine peut être libérée depuis l’axone mais aussi depuis le soma ou les dendrites de la cellule (Liu et al., 2021 ; Liu and Kaeser, 2019 ; Sulzer et al., 2016).

ii. Libération axonale et somatodendritique

Au niveau de l’axone, la sécrétion de dopamine est régulée par de multiples facteurs, dont les concentrations de dopamine et de calcium intracellulaires (Sulzer et al., 2016). L’arborisation axonale des neurones DA est dense. La sécrétion de la dopamine peut être synaptique ou extra-synaptique (Figure 7) et s’effectue avec une grande précision temporelle et spatiale. Au niveau des synapses, la dopamine est libérée dans la fente synaptique face à des récepteurs post-synaptiques (Liu et al., 2021 ; Liu and Kaeser, 2019 ; Sulzer et al., 2016). Le site post-synaptique et ses récepteurs, maintenus à proximité par des protéines trans-synaptiques d’adhésion (neurexines et neuroligines), se trouvent à quelques nanomètres du site d’exocytose (Figure 7). Cependant, la majorité (80%) des terminaisons axonales actives des neurones DA sont extra-synaptiques (Ducrot et al., 2021). Elles se distinguent notamment des sites synaptiques par le fait qu’elles ne présentent pas de structures post-synaptiques définies et ont une zone active d’une composition différente. Par exemple, la protéine d’échafaudage Bassoon n’y est pas exprimée (Ducrot et al., 2021 ; Liu et al., 2021 ; Südhof, 2012). La dopamine ainsi sécrétée va diffuser, parfois sur quelques centaines de nanomètres, avant de rencontrer un de ses récepteurs (« *volume transmission* ») (Li et al., 2021) (Figure 7). De plus, le soma et les dendrites des neurones DA peuvent libérer de la dopamine (**libération somato-dendritique**). Ceci a été mis en évidence notamment par le fait que la stimulation électrique de la VTA induit une augmentation des niveaux de dopamine extracellulaire au sein de la VTA, mesurée par voltammétrie (Ford et al., 2010). Cette libération somato-dendritique nécessite également du calcium (Chen et al., 2011, 2006 ; Ford et al., 2010). L’intérêt de la sécrétion de dopamine au sein même de la structure est vraisemblablement un moyen pour les neurones DA de rétro-contrôler leur activité.

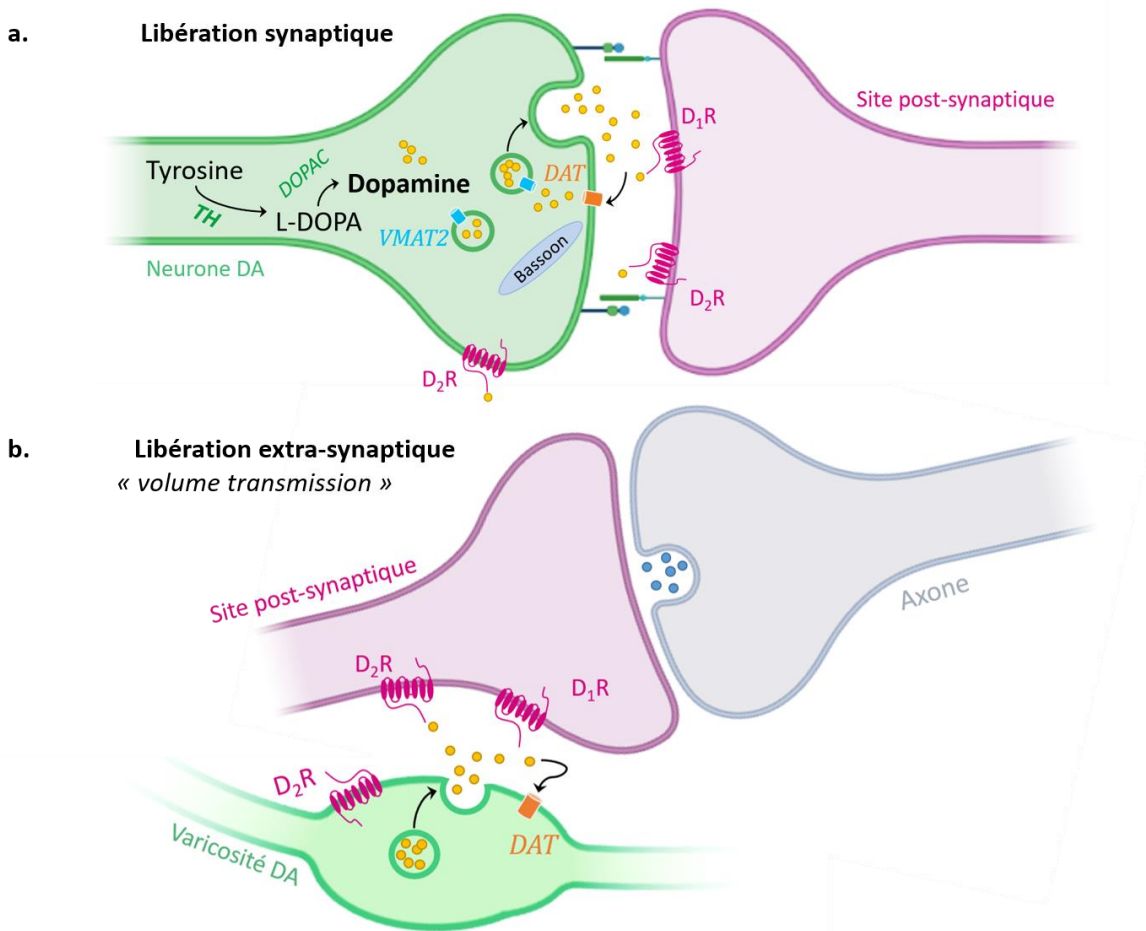


Figure 7. Libération axonale de dopamine. (a) Libération au site pré-synaptique. Le site post-synaptique est maintenu à proximité par des neurexines (pré-synaptique) et des neuroligines (post-synaptique). La dopamine ainsi libérée diffuse dans la fente synaptique sur quelques nanomètres. (b) Libération extra-synaptique de dopamine, par un bouton axonal de type 'en-passant'. La dopamine libérée peut diffuser sur quelques centaines de nanomètres. TH : Tyrosine Hydroxylase ; DOPAC : DOPA-décarboxylase ; VMAT2 : transporteur vésiculaire des monoamines 2 ; DAT : transporteur à la dopamine ; D₁R : récepteur à la dopamine de type 1 ; D₂R : récepteur à la dopamine de type 2. Schéma créé à l'aide de [BioRender.com](https://www.biorender.com)

Une fois libérée, la dopamine peut alors (1) se fixer à un de ses récepteurs / autorécepteurs, ou (2) être récupérée par son transporteur, DAT, afin d'être dégradée ou stockée, de nouveau, dans des vésicules synaptiques (German et al., 2015).

iii. Les récepteurs dopaminergiques

Les récepteurs à la dopamine sont présents à la fois aux niveaux post-synaptique, péri-synaptique ou extra-synaptique (Boyson and Molinoff, 1986 ; Liu et al., 2021). Basée sur l'observation que la dopamine module la synthèse d'adénosine monophosphate cyclique

(AMPc), en 1979, Keibian et Calne ont proposé une première classification de ces récepteurs en se basant sur leur couplage à une adénylate-cyclase (AC) (Keibian and Calne, 1979). Ils ont ainsi défini deux groupes de récepteurs couplés aux protéines G (« *G protein-coupled receptors* », GPCR) : les récepteurs D₁ (D₁R) et les récepteurs D₂ (D₂R) (Figure 7-8). Par une classification selon leurs propriétés structurales et fonctionnelles (notamment pharmacologiques), la définition des types de récepteurs à la dopamine s'est affinée. Des travaux ultérieurs ont permis de caractériser, au total, cinq sous-types de récepteurs (Beaulieu and Gainetdinov, 2011 ; Missale et al., 1998). Les cinq sous-types de récepteurs sont subdivisés en deux grands groupes :

- Les **récepteurs de type D₁** (comprenant les récepteurs D₁ et D₅) sont exprimés par des neurones non-DA et sont couplés à une protéine G $\alpha_{s/olf}$, activatrice d'AC et de la synthèse de l'AMPc (Figure 8). L'AMPc promeut l'activation de la protéine kinase A (PKA) et ainsi la phosphorylation de ses cibles. L'une d'entre elles est la protéine DARPP-32, un amplificateur des effets de la PKA et un médiateur de la réponse DA (Fernandez et al., 2005 ; Girault and Nairn, 2021). Ainsi, l'activation de ces récepteurs promeut l'excitabilité neuronale. Ces récepteurs sont fortement exprimés dans le cortex (Smiley et al., 1994).
- Les **récepteurs de type D₂** (comprenant les récepteurs D₂, D₃ et D₄) sont couplés à une protéine G α_i , inhibitrice d'AC et de la synthèse de l'AMPc (Figure 8). Ces récepteurs sont fortement exprimés dans le NAcc, et dans une moindre mesure dans le cortex. Lorsqu'ils sont exprimés par les neurones DA, les récepteurs D₂ et D₃ sont des autorécepteurs. Ils ont alors un rôle de rétrocontrôle négatif dans l'activité des neurones qui les expriment (Ford, 2014 ; Ford et al., 2010 ; Keibian and Calne, 1979).

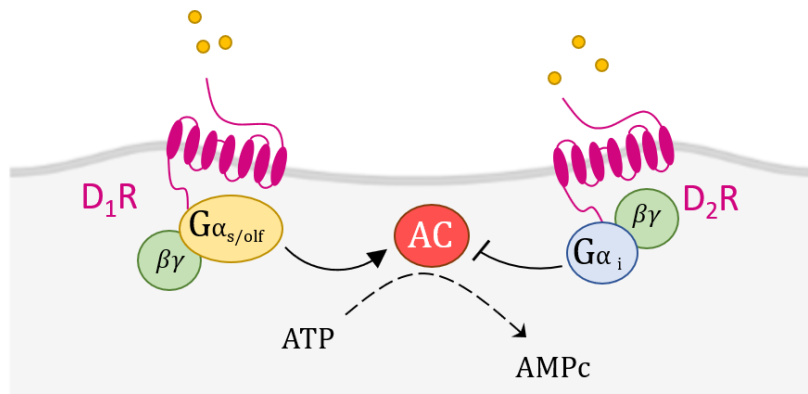


Figure 8. Les récepteurs dopaminergiques D₁ (D₁R) activent l'adénylate cyclase (AC) alors que les récepteurs dopaminergiques D₂ (D₂R) l'inhibent. ATP : adénosine triphosphate ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique. Schéma créé à l'aide de [BioRender.com](https://www.biorender.com)

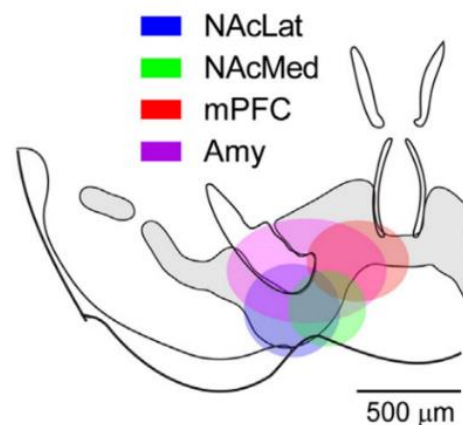
iv. Cibles des projections dopaminergiques

Les neurones DA ciblent plusieurs structures au sein du cerveau. Ils contribuent notamment à la modulation des signalisations glutamatergiques et GABAergiques (Beaulieu and Gainetdinov, 2011 ; Greengard, 2001). En effet, la signalisation DA peut réguler l'efficacité de la libération de neurotransmetteurs ainsi que contrôler les états de phosphorylation des récepteurs post-synaptiques, modulant ainsi les liaisons ligands-récepteurs (Greengard, 2001). Bien qu'ils semblent cibler préférentiellement les structures ipsilatérales, certains neurones DA projettent sur des régions controlatérales. Il s'agit notamment de neurones dont les corps cellulaires se trouvent dans la région médiane de la VTA (CLi, RLi, IF) (Swanson, 1982). De plus, certaines études suggèrent une organisation topographique des cellules DA au sein de la VTA dépendamment de la cible de leur axone (Beier et al., 2015) (Figure 9).

Figure 9. Organisation topographique des cellules TH-positives de la VTA selon la cible de leurs projections axonales.

NAcLat : noyau accumbens latéral ; NAcMed : noyau accumbens médian ; mPFC : cortex préfrontal médian ; Amy : amygdale.

Adapté de Beier et al. (2015)



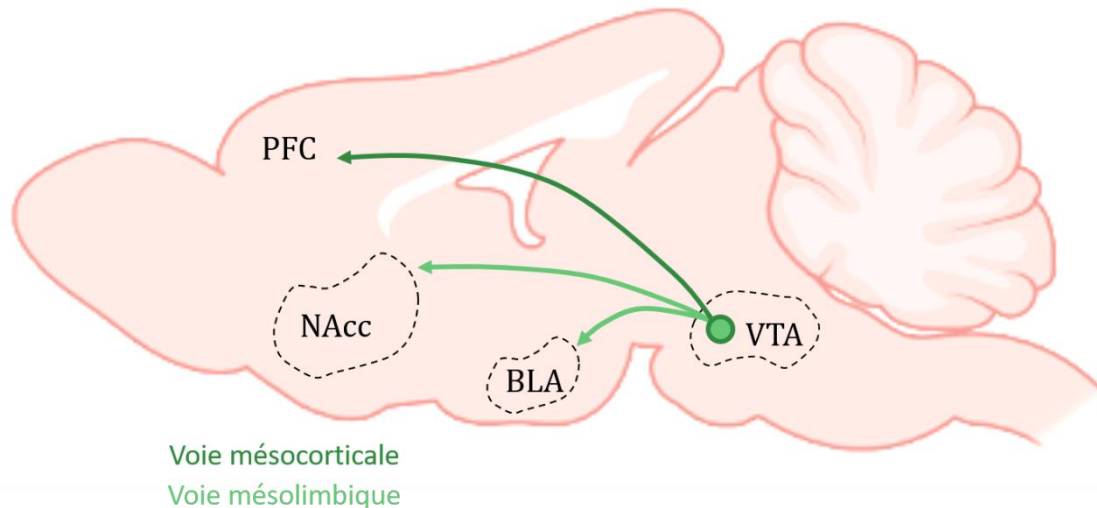


Figure 10. Schéma des projections des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA) au sein des voies méso-corticale et mésolimbique, sur une coupe sagittale de cerveau de souris. En vert foncé, les projections dopaminergiques impliquées dans les voies mésolimbiques. En vert clair, la voie méso-corticale. PFC : cortex préfrontal ; NAcc : nucleus accumbens ; BLA : amygdale basolatérale. Schéma créé à l'aide de [BioRender.com](https://www.biorender.com)

Les projections dopaminergiques partant des neurones DA de la VTA ont **trois cibles principales** (Swanson, 1982) : le NAcc, le PFC médian et l'amygdale. Sur la base de ces efférences, deux systèmes principaux sont définis : la voie mésolimbique (VTA → système limbique, dont le NAcc et l'amygdale basolatérale) et la voie méso-corticale (VTA → PFC médian) (Figure 10).

Le **noyau accumbens** (NAcc) forme avec le tubercule olfactif, la partie ventrale du striatum. Il est principalement (>90%) constitué de cellules GABAergiques de taille moyenne appelées « *medium-spiny neurons* » (MSNs) (Gerfen, 1988). Les MSNs du NAcc se subdivisent en deux classes selon les récepteurs qu'ils expriment : les neurones qui expriment le récepteur D₁ (D₁R+) ou le récepteur D₂ (D₂R+). Les neurones DA forment des synapses symétriques sur les cellules du NAcc (Pickel et al., 1988 ; Zhang et al., 2015). La dopamine module leur activité en fonction des récepteurs qu'ils expriment (Janssen et al., 2009 ; Woodruff et al., 1976). Les neurones pyramidaux et les interneurons à parvalbumine (PV+) du **cortex préfrontal** (PFC) expriment principalement les D₁R (Anastasiades et al., 2019). Enfin, une proportion significative de cellules DA de la VTA cible l'**amygdale basolatérale** (BLA) (Lammel et al., 2012 ; Nguyen et al., 2021 ; Swanson, 1982).

Les trois structures mentionnées ci-dessus ne sont pas les seules régions ciblées par des projections DA dans le cerveau (Swanson, 1982), comme le suggère l'expression des D₁R et D₂R dans de nombreuses structures cérébrales (Hall et al., 1994 ; Kebabian and Calne, 1979 ; Missale et al., 1998 ; Smiley et al., 1994). Par exemple, les neurones DA de la VTA projettent également vers l'hippocampe (HPC), le pallidum ventral (VP) et le noyau du lit de la stria terminalis (BST) (Morales and Margolis, 2017 ; Swanson, 1982).

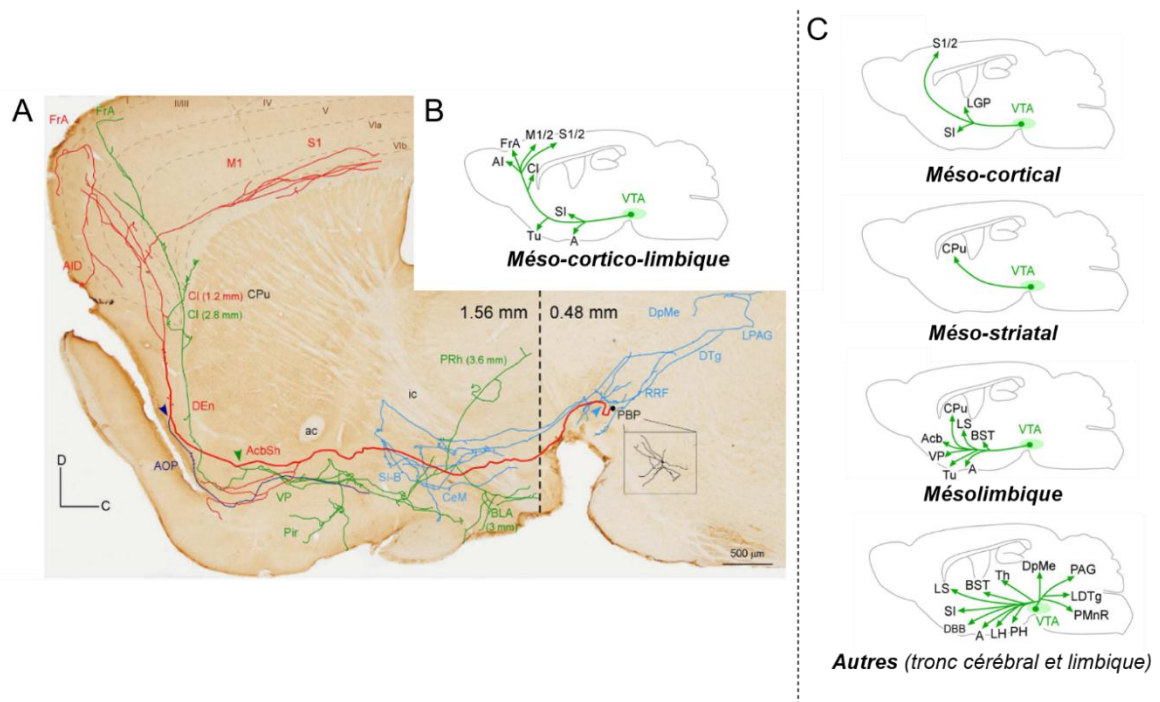


Figure 11. (A) Reconstruction sagittale d'un unique neurone méso-cortico-limbique dopaminergique de la VTA. L'axone principal (trait rouge et gras) atteint le cortex cérébral et possède trois collatérales (bleu clair, vert et bleu foncé) qui ciblent des structures limbiques. **(B) Dessin schématique des projections et structures innervées par les neurones méso-cortico-limbiques,** et **(C) par les neurones méso-corticaux, méso-striataux, mésolimbique et ceux ciblant le tronc cérébral.** A : complexe amygdaloïde ; Acb : noyau accumbens ; AcbSh : shell du Acb ; AI : cortex insulaire agranulaire ; AOP : aire olfactive postérieure ; BLA : amygdale basolatérale ; BST : noyau du lit de la stria terminalis ; C : caudal ; CeM : complexe amygdaloïde central et médian ; Cl : claustrum ; CPu : putamen caudé ; D : dorsal ; DBB : bandelette diagonale de Broca ; Den : claustrum endopiriforme dorsal ; DpMe : noyau mésencéphalique profond ; DTg : noyau tegmentaire dorsal ; FrA : cortex frontal d'association ; LDTg : noyau tegmentaire latéro-dorsal ; LGP : globus pallidus latéral ; LH : hypothalamus latéral ; LS : noyau septal latéral ; M1/2 : cortex moteur primaire et secondaire ; PAG : matière grise périaqueducule ; LPAG : PAG latérale ; PBP : noyau pigmenté parabrachial de la VTA ; PH : hypothalamus postérieur ; Pir : cortex piriforme ; PMnR : noyau du raphé paramédian ; PRh : cortex périrhinal ; RRF : aire rétro-rubrale ; S1/2 : cortex somatosensoriel primaire et secondaire ; SI : *substantia innominata* ; SI-B : SI basale ; Th : thalamus ; Tu : tubercule olfactif ; VP : pallidum ventral. Adaptée de Aransay et al. (2015)

De plus, certains neurones de la VTA (« neurones méso-cortico-limbiques ») projettent à la fois sur des structures du cortex cérébral et des régions limbiques comme le pallidum ventral et l'amygdale (Aransay et al., 2015) (Figure 11). Ainsi, la séparation des projections dopaminergiques partant de la VTA en systèmes différenciés (méso-cortical et mésolimbique) n'est pas strictement justifiée d'un point de vue anatomique.

v. *Récupération et dégradation*

La dopamine libérée dans le milieu extracellulaire lie le transporteur de la dopamine (« *dopamine active transporter* », DAT ou SLC6A3) et est ainsi transférée au sein du neurone. Elle est ensuite intégrée dans des vésicules par VMAT2, ou dégradée (German et al., 2015).

2) Principales entrées synaptiques sur les neurones dopaminergiques de la VTA

La signalisation DA médiée par les neurones DA de la VTA résulte de la sommation des entrées excitatrices et inhibitrices qu'ils reçoivent. La libération de dopamine dans les structures ciblées par la VTA en dépend. L'utilisation de marqueurs rétrogrades ou antérogrades a permis de mettre en évidence la pluralité des structures projetant vers la VTA. L'utilisation d'un marquage trans-synaptique antérograde a permis d'identifier 22 régions cérébrales ciblant à la fois les neurones DA et les neurones GABA de la VTA (Beier et al., 2015). Ici, nous ne mentionnerons que les principales entrées synaptiques excitatrices et inhibitrices que reçoivent les neurones DA de la VTA (Figure 12), et nous évoquerons certaines afférences modulatrices.

i. *Le cortex préfrontal*

Le **cortex préfrontal** (PFC) regroupe plusieurs cortex de la partie antérieure du cerveau, dont le PFC médian (mPFC). Des cellules glutamatergiques (VGLUT1+) des couches profondes du PFC projettent leurs axones vers les neurones DA de la VTA (Gabbott et al., 2005 ; Gariano and Groves, 1988 ; Geisler et al., 2007 ; Watabe-Uchida et al., 2012). L'activité des neurones DA de la VTA est fortement régulée par le PFC (Carr and Sesack, 2000 ; Lodge, 2011 ; Zhang and Shi, 1999). Par exemple, la stimulation du PFC médian (mPFC) induit une réponse excitatrice seulement chez 25% des neurones DA enregistrés et elle est inhibitrice chez 44% d'entre eux (Lodge, 2011). Les neurones Glut du mPFC sont capables d'une décharge en bursts.

L'induction d'une telle activité dans le mPFC induit une augmentation de l'activité de décharge en potentiels d'actions et en bursts pour 94% des neurones DA enregistrés (Zhang and Shi, 1999). Le mPFC cible particulièrement les neurones DA impliqués dans la voie mésolimbique, projetant leur axone dans le NAcc latéral (Beier et al., 2015). D'autres travaux suggèrent que les neurones Glut du PFC forment des synapses sur les dendrites des neurones DA mésocorticaux (ciblant le PFC en retour), mais ne font pas (ou peu) de connexions sur les neurones DA ciblant le NAcc (Carr and Sesack, 2000).

ii. Les noyaux tegmentaux pédonculopontin et latérodorsal

Les **noyaux tegmentaux pédonculopontin** et **latérodorsal** (« *peduncunlopontine tegmental nucleus* », PPTg et « *laterodorsal tegmental nucleus* », LDTg) contiennent des neurones glutamatergiques VGLUT2+ qui forment des synapses sur les neurones DA de la VTA (Clements and Grant, 1990 ; Geisler et al., 2007). L'activité des neurones Glut du PPTg module positivement celles des neurones DA de la VTA (Floresco et al., 2003). De plus, le LDTg et la partie caudale du PPTg émettent des projections cholinergiques vers la VTA (Oakman et al., 1995). Les inputs Glut et cholinergiques des PPTg et LDTg contrôlent l'activité de bursts des neurones DA de la VTA (Floresco et al., 2003 ; Sesack and Grace, 2010). Enfin, les neurones Glut du PPTg pourraient constituer un relais intermédiaire entre le PFC et la VTA (Carr and Sesack, 2000).

iii. Le nucleus accumbens

Au sein du **NAcc**, seuls les MSNs D₁R+ font des connexions avec la VTA. Bien qu'ils projettent vers les neurones DA, ils ciblent préférentiellement les neurones GABA (Bocklisch et al., 2013 ; Xia et al., 2011). Ainsi, le NAcc peut à la fois moduler positivement (en les désinhibant) et négativement l'activité des neurones DA de la VTA. La boucle *NAcc* (\rightarrow *neurones GABA de la VTA*) \rightarrow *neurones DA de la VTA* \rightarrow *NAcc* représente un rétrocontrôle important dans la régulation de l'activité des neurones DA de la VTA. De plus, à ces projections directes ('voie directe') entre NAcc et VTA, il existe une autre voie. Cette voie, dite 'indirecte', implique un intermédiaire entre les MSNs et les DA de la VTA, le pallidum ventral (Kupchik et al., 2015).

iv. *Le pallidum ventral*

Le **pallidum ventral** (« *ventral pallidum* », VP) est une structure des ganglions de la base. Il contient principalement des neurones GABA (identifiés par l'ARN de GAD1 et/ou GAD2) et, de manière plus minoritaire, des neurones Glut (exprimant VGLUT2, et plus rarement VGLUT3) et cholinergiques (Root et al., 2015). Les projections provenant du VP, et qui ciblent la VTA, proviennent principalement de neurones GABA (Kalivas et al., 1993) et de neurones Glut VGLUT2+ (Geisler et al., 2007). L'inhibition des neurones GABA du VP sur les neurones DA de la VTA est particulièrement forte (Floresco et al., 2003 ; Hjelmstad et al., 2013 ; Root et al., 2015). Par les projections VGLUT2+ qu'ils envoient vers la VTA, les neurones Glut du VP modulent cette inhibition (Geisler et al., 2007). Le VP reçoit des afférences provenant du NAcc (Kupchik et al., 2015 ; Root et al., 2015). Puisque les neurones GABA du VP reçoivent des afférences du NAcc et projettent sur des cibles dopaminergiques, le VP est un intermédiaire dans la boucle de rétrocontrôle *NAcc* (\rightarrow *VP*) \rightarrow *neurones DA de la VTA* \rightarrow *NAcc*. Cet intermédiaire, par la sécrétion de glutamate et de GABA dans la VTA, peut moduler le rétrocontrôle de la signalisation DA. De plus, le VP a des afférences ciblant le PFC, l'amygdale basolatérale (BLA) et l'hypothalamus latéral (LH). Des connexions locales entre les neurones du VP existent également (Root et al., 2015).

v. *Le noyau du lit de la stria terminalis*

Le **noyau du lit de la stria terminalis** (« *bed nucleus of the stria terminalis* », BST) est une structure complexe à l'interface entre plusieurs régions cérébrales (PFC, NAcc, BLA) qui est impliquée dans les processus d'anxiété / de stress, et les comportements liés au système de la récompense (Georges and Aston-Jones, 2002 ; Herman and Cullinan, 1997). Le BST est formé de 90% de cellules GABA, 7% de cellules GABA/Glut (VGLUT3+) et 3% de neurones Glut (VGLUT2+) (Geisler et al., 2007 ; Kudo et al., 2012). Ces proportions sont conservées parmi les types cellulaires du BST qui ciblent la VTA (~90% de neurones GABA, ~4% de neurones GABA/Glut et ~4% de neurones Glut) (Kudo et al., 2012). Les neurones de la partie ventrale du BST ciblent significativement plus la VTA que ceux de la partie dorsale (Massi et al., 2008). Les neurones GABA du BST forment préférentiellement des synapses sur les neurones GABA de la VTA (et dans une moindre mesure, les neurones DA de la VTA) tandis que les neurones Glut du BST semblent cibler préférentiellement les neurones DA de la VTA

(Geisler et al., 2007 ; Georges and Aston-Jones, 2002, 2001 ; Kudo et al., 2012). Les neurones Glut du BST qui projettent leur axone sur les neurones DA de la VTA influencent leur activité en burst (Georges and Aston-Jones, 2002 ; Jalabert et al., 2009). Enfin, le BST a été identifié comme un relai entre le cortex infralimbique, une région du PFC, et les neurones de la VTA. Le BST pourrait avoir le rôle d'un amplificateur de la transmission excitatrice émanant du cortex infralimbique vers la VTA (Massi et al., 2008).

vi. L'hypothalamus latéral

L'**hypothalamus latéral** (LH) comprend 15% des neurones VGLUT2+ qui projettent sur la VTA (Geisler et al., 2007). Les neurones Glut du LH ciblent préférentiellement les neurones GABA de la VTA, et plus rarement les neurones DA (Nieh et al., 2016, 2015). Leur activation cause une diminution des niveaux de dopamine dans le NAcc (Nieh et al., 2016). Les neurones GABA du LH projettent leur axone sur les neurones GABA et les neurones DA de la VTA. Leur stimulation augmente l'activité des neurones DA de la VTA, principalement, en permettant la désinhibition de ces derniers (Nieh et al., 2016). En effet, tout comme les neurones Glut de la région, leur signalisation est plus importante sur les neurones GABA de la VTA (Nieh et al., 2016, 2015). La plupart des neurones du LH ciblant la VTA, en plus d'exprimer un neurotransmetteur (glutamate ou GABA), sécrètent des neuromodulateurs, dont l'orexine et la dynorphine : alors que l'orexine a un effet excitateur, la dynorphine inhibe l'activité de certains neurones DA de la VTA (Muschamp et al., 2014).

vii. L'habenula latérale

L'**habenula latérale** (LHb) émet autant de synapses Glut sur les neurones DA de la VTA que sur les neurones GABA. Chez le rat, ~7% des neurones VGLUT2+ qui projettent sur la VTA ont leur corps cellulaire dans la LHb (Geisler et al., 2007). La stimulation de la LHb induit une inhibition des neurones DA de la VTA (Christoph et al., 1986 ; Stopper et al., 2014). Cette forte inhibition de la LHb sur les neurones DA de la VTA s'explique par le fait que les neurones Glut de la LHb projettent également sur les neurones GABA du noyau tegmental rostromédial (RMTg), qui eux-mêmes projettent sur les neurones DA de la VTA (Balcita-Pedicino et al., 2011 ; Jhou et al., 2009).

viii. *Le noyau tegmental rostromédial*

Le **noyau tegmental rostromédial** (RMTg, parfois confondu avec la tVTA) comprend des neurones GABA qui projettent sur les neurones DA de la VTA, y induisant une forte inhibition (Balcita-Pedicino et al., 2011 ; Zhou et al., 2009). A l'inverse, l'inhibition des neurones GABA du RMTg contribue à l'excitation des neurones DA dans la VTA (Lecca et al., 2011). De plus, le RMTg est considéré comme un relais entre la LHb et les neurones DA de la VTA (Balcita-Pedicino et al., 2011 ; Lecca et al., 2011). La LHb, comme nous l'avons indiqué précédemment, envoie des projections Glut vers les neurones DA de la VTA mais ses projections additionnelles vers les neurones GABA du RMTg permet en plus un contrôle fin de la balance excitation/inhibition aux synapses des neurones DA de la VTA. Par leur réponse aux drogues (opioïdes, cannabinoïdes, nicotine), les neurones GABA du RMTg sont impliqués dans le contrôle du système de la récompense (Lecca et al., 2011).

ix. *Le noyau du raphé dorsal*

Le **noyau du raphé dorsal** (DRN) est constitué d'une population hétérogène de cellules neuronales sécrétant du glutamate, du GABA et de la sérotonine. La majorité des afférences provenant du DRN et qui cible la VTA sont glutamatergiques (Beier et al., 2015 ; Qi et al., 2014). Les neurones Glut du DRN ciblent les neurones DA de la VTA, mais également les neurones GABA (Qi et al., 2014). La stimulation optogénétique des fibres VGLUT3+ du DRN qui ciblent la VTA induit une libération de dopamine dans le NAcc (Qi et al., 2014).

Le DRN est également une source de sérotonine. Les cellules du DRN qui projettent sur la VTA sont soit TPH2+ (expriment la tryptophane hydroxylase 2) et VGLUT3+ soit TPH2+ et n'expriment pas VGLUT3 (Chang et al., 2021). Les effets de la sérotonine sur les neurones DA sont multiples et dépendent des récepteurs sérotoninergiques exprimés. Il en existe sept dont certains ont des sous-types (pour un total de treize sous-types de récepteurs à la sérotonine) (De Deurwaerdère and Di Giovanni, 2017).

x. *L'aire tegmentale ventrale*

Les **neurones GABA de la VTA** jouent un rôle majeur d'intermédiaire entre les neurones DA de la VTA et la plupart des structures cérébrales mentionnées précédemment. Les

neurones DA et les neurones GABA de la VTA reçoivent des entrées synaptiques provenant des mêmes régions cérébrales (Beier et al., 2015). Les neurones GABA de la VTA forment des synapses inhibitrices sur les neurones DA de la VTA se trouvant à proximité (Dobi et al., 2010; Omelchenko and Sesack, 2009).

Les **neurones Glut de la VTA** forment des synapses sur les neurones GABA et DA de la VTA, établissant un circuit local qui intervient dans la modulation de l'activité des neurones DA de la VTA (Dobi et al., 2010). Cette modulation des neurones DA de la VTA peut provenir d'afférences directes, mais également du fait que certains neurones Glut de la VTA ciblent le mPFC qui en retour envoie des projections vers les neurones DA de la VTA. Un tel réseau permettrait aux neurones Glut de la VTA de contrôler à la fois directement et indirectement l'activité des neurones DA (Dobi et al., 2010).

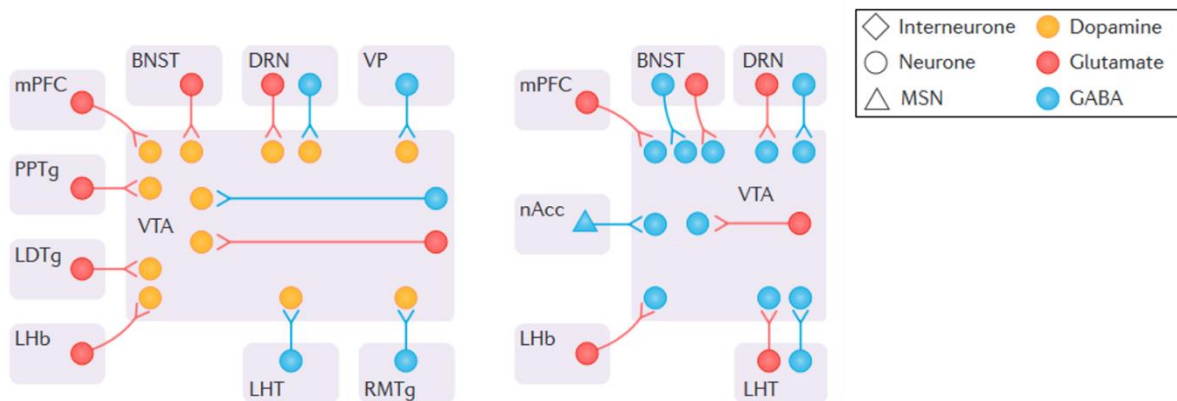


Figure 12. Afférences ciblant les neurones dopaminergiques (gauche) et GABAergiques (droite) de l'aire tegmentale ventrale (VTA); mPFC : cortex préfrontal médian; PPTg et LDTg : noyaux tegmentaux pédonculopontin et latérodorsal; Lhb : habenula latérale; LHT : hypothalamus latéral; RMTg : noyau tegmental rostromédial; VP : pallidum ventral; DRN : noyau du raphé dorsal; BNST : noyau du lit de la stria terminalis (= BST); nAcc : nucleus accumbens; MSN : medium-spiny neurons. Adaptée de Morales et Margolis (2017)

3) Le système de récompense

L'existence d'un système de récompense a été mis en évidence par Olds & Milner (Olds and Milner, 1954) avant même la découverte du rôle de la dopamine dans le cerveau. Ils ont observé que la stimulation de plusieurs régions cérébrales comprises entre l'aire septale et le mésencéphale (axe D-V), et le cortex cingulaire et le noyau sous-thalamique (axe A-P), crée un effet de récompense chez le rat. Ils en ont déduit que ces régions, ensemble, pourraient

constituer un réseau de récompense. Trois années plus tard, Carlsson et al. (Carlsson et al., 1957) publiaient leur découverte de la dopamine dans le cerveau. Depuis, de nombreux travaux ont mis en évidence l'implication de la dopamine et de la VTA dans les processus de récompense, d'aversion, et d'apprentissage (Arias-Carrión et al., 2010 ; Bariselli et al., 2016 ; Bromberg-Martin et al., 2010 ; Gunaydin et al., 2014 ; Keiflin et al., 2019 ; Lammel et al., 2012 ; Olds and Milner, 1954 ; Russo and Nestler, 2013 ; Yeh et al., 2018). Ces différents comportements mettent en jeu des sous-circuits distincts au sein de la VTA. Par exemple, la stimulation optogénétique des afférences du LDTg qui ciblent la VTA induit des comportements associés à la récompense (ici, la préférence de lieu conditionnée ou « *conditioned place preference* », CPP), tandis que celle des afférences de la LHb promeut l'évitement (ici, l'évitement de lieu conditionné ou « *conditioned place aversion* », CPA) (Lammel et al., 2012). Au sein de la VTA, des neurones DA méso-striataux semblent être les acteurs des mécanismes de récompense, alors que les neurones DA méso-corticaux pourraient médier l'aversion (Lammel et al., 2012) (Figure 13).

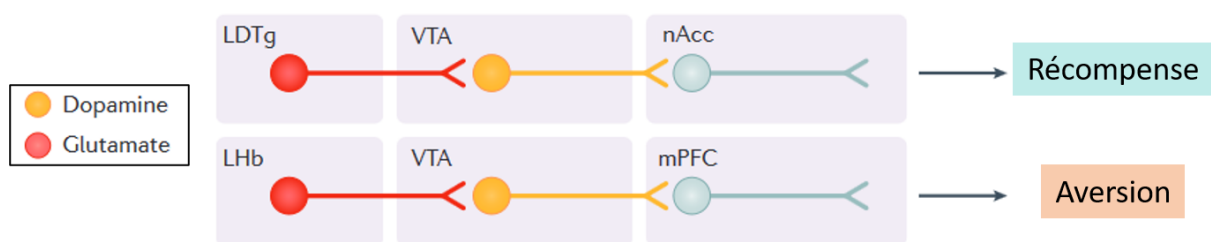


Figure 13. Exemples de circuits impliqués dans le système de la récompense ; LHb : habenula latérale ; VTA : aire tegmentale ventrale ; mPFC : cortex préfrontal médian ; LDTg : noyaux tegmentaux latérodorsal ; nAcc : nucleus accumbens.

Adaptée de Morales et Margolis (2017)

3. L'activité des neurones dopaminergiques de la VTA et ses régulateurs

1) Signatures électrophysiologiques des neurones dopaminergiques de la VTA

In vivo, les neurones DA peuvent être inactifs (silencieux) ou, actifs dans le cas d'une décharge de potentiels d'actions (« *action potential* », AP). Deux modes de décharge sont observés : la décharge dite tonique et la décharge phasique (Liu et al., 2021). Toutes deux participent à la régulation du réseau et au contrôle des niveaux de dopamine libérée dans les régions cibles (notamment le NAcc, le PFC, et la BLA). Les deux types d'activité des neurones DA se différencient notamment par la fréquence de décharge des AP (Figure 14). L'**activité**

tonique est caractérisée par des AP à basse fréquence (entre 0,5 Hz et 10 Hz, avec une moyenne comprise entre 3 et 5 Hz) (Liu et al., 2021), suivant un rythme relativement régulier (Putzier et al., 2009). La **décharge phasique**, également appelée décharge en **bursts**, se caractérise par une succession de 3 à 10 AP (« burst »), avec un intervalle de temps entre deux AP consécutifs inférieur à 80 millisecondes en début de burst et, au maximum, de 150 millisecondes à la fin du burst, pour une fréquence de décharge en AP supérieure à 10 Hz au sein du burst (Gariano and Groves, 1988 ; Liu et al., 2021). Une période réfractaire, d’inhibition, est présente après le burst (Gariano and Groves, 1988 ; Overton and Clark, 1997). Les bursts peuvent être induits notamment par la stimulation des afférences des neurones DA. Par exemple, les stimulations du mPFC (Gariano and Groves, 1988 ; Lodge, 2011 ; Zhang and Shi, 1999), du PPTg (Floresco et al., 2003 ; Sesack and Grace, 2010) et du BST (Georges and Aston-Jones, 2002) induisent une décharge phasique dans les neurones DA du mésencéphale. Le PPTg et le BST sont des structures pouvant être considérées comme des ‘relais amplificateurs’ de la signalisation glutamatergique provenant du mPFC et ciblant la VTA. Ainsi, l’activité en bursts des cellules DA dépend de la transmission excitatrice (principalement contrôlée par le mPFC) qu’elles perçoivent (Overton and Clark, 1997). Bien que ces deux modes de décharge soient considérés comme indépendants, les neurones peuvent alterner entre ces deux types d’activité (Liu et al., 2021). Par ailleurs, le déclenchement des potentiels d’action, que ce soit par le biais d’une décharge tonique ou phasique, n’est pas toujours corrélé à une libération axonale de neurotransmetteurs. De la dopamine est toujours libérée dans l’espace extra-synaptique lors du blocage de l’activité de décharge des neurones DA, ce qui met en évidence l’existence de systèmes de régulation localisés à la synapse (Suaud-Chagny et al., 1992). Néanmoins, la décharge en bursts est plus à même de permettre l’exocytose de grandes quantités de dopamine (Gonon, 1988). Enfin, l’étude de ces modes de décharge *in vivo* des neurones DA peut

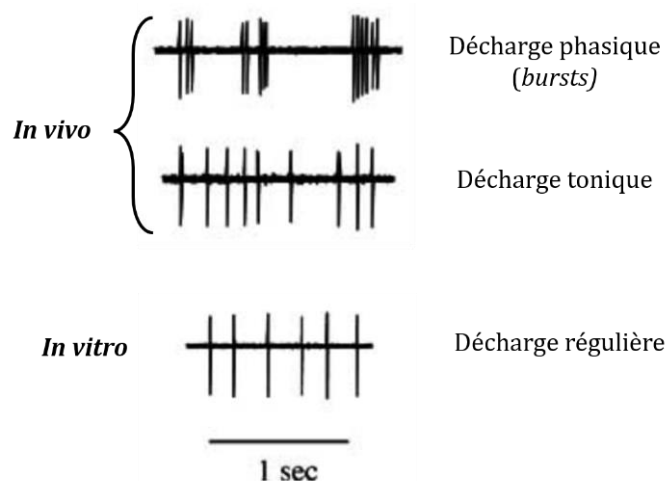


Figure 14. Exemples de pattern de décharge de neurones dopaminergiques enregistrés chez le rat
Adaptée de White et al. (2016)

nécessiter l'utilisation de sédatifs, d'hypnotiques et d'anesthésiants. Les modes de décharge diffèrent selon l'état de vigilance de l'animal étudié, et selon les protocoles utilisés pour la sédation ou l'anesthésie (Overton and Clark, 1997 ; White et al., 2006).

In vitro, la majorité des neurones DA de la VTA ne déchargent pas spontanément et dans des tranches de cerveau, ils peuvent éventuellement présenter une activité régulière de type *pacemaker*, mais pas de décharge en bursts (Figure 14).

Néanmoins, ces neurones présentent une caractéristique électrophysiologique qui les distinguent des autres neurones de la VTA : la présence d'un « *voltage sag* » (un changement de voltage dépolarisant) en réponse à l'injection d'un courant hyperpolarisant lors d'enregistrements de patch clamp en courant-imposé (« *current-clamp* »). Ce sag reflète l'existence d'un courant cationique médié par les canaux HCN, le courant I_h , observable en voltage imposé (« *voltage-clamp* ») (White et al., 2006) (Figure 15).

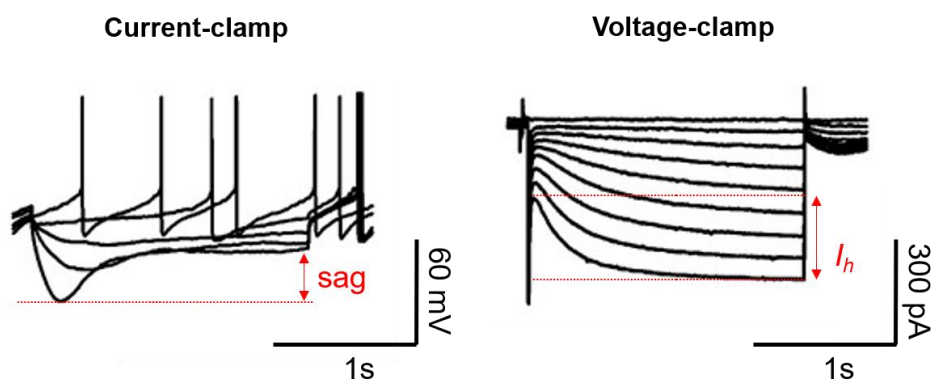


Figure 15. Exemples de « *voltage sag* » (gauche) et de courants I_h (droite) enregistrés dans des neurones dopaminergiques de la VTA chez le rat. À gauche, la flèche désigne l'amplitude d'un *voltage sag* enregistré en réponse à l'injection d'un courant hyperpolarisant. À droite, la flèche désigne l'amplitude d'un courant I_h enregistré en voltage-clamp.

Adaptée de Xiao et al. (2009)

2) Régulateurs de l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA

Les afférences synaptiques que reçoivent les neurones DA de la VTA participent au contrôle de leur activité de décharge et à la modulation de la libération de dopamine au site d'exocytose. Ainsi, l'expression de récepteurs des signalisations glutamatergique et GABAergique et leur modulation participent à la régulation de l'activité des neurones DA. En

plus de ces entrées synaptiques, les neurones DA possèdent d'autres mécanismes intrinsèques de régulation et de rétrocontrôle de leur activité, notamment via l'expression d'autorécepteurs aux niveaux présynaptique et somato-dendritique, ainsi que celle de protéines canaux perméables au calcium et au potassium (Figure 16).

i. Modulations par les signalisations excitatrices et inhibitrices

Transmission glutamatergique

Les principaux récepteurs au glutamate exprimés par les neurones DA de la VTA sont les récepteurs ionotropiques AMPA et NMDA, perméables au sodium et au calcium. Alors que la stimulation des récepteurs AMPA (AMPA_R) n'a pas d'effet majeur sur l'activité de décharge des neurones DA de la VTA, l'activation des récepteurs NMDA (NMDA_R) induit une décharge en bursts (Overton and Clark, 1997 ; Chergui et al., 1993 ; Deister et al., 2009 ; Zakharov et al., 2016). Inversement, le blocage des AMPA_R par du 6-cyano,7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) n'a que peu d'impact sur la décharge spontanée des neurones DA, tandis que l'utilisation d'acide (±)2-amino,5-phosphonopentanoïque (D-APV), un antagoniste spécifique des NMDA_R, induit une diminution de l'activité en bursts, en régularisant la décharge des AP (Chergui et al., 1993). L'activité des NMDA_R seule ne suffit pas à induire et contrôler la décharge en bursts des neurones DA de la VTA et son effet semble médié par les canaux potassiques à faible conductance dépendant du calcium (les canaux SK, voir ci-après) (Etchepare et al., 2021 ; Deister et al., 2009). La composition des NMDA_R en sous-unités et leur nombre peuvent influencer sur leur modulation de l'activité neuronale mais également leur dynamique de surface à la membrane dendritique (Etchepare et al., 2021).

Transmission GABAergique

Les neurones DA de la VTA reçoivent également de multiples afférences inhibitrices médiées par la signalisation du GABA. Ces cellules DA expriment des récepteurs GABAergiques : les récepteurs GABA_A (GABA_AR) et GABA_B (GABA_BR) (Theile et al., 2011 ; Westerink et al., 1996). *In vivo*, la stimulation électrique du RMTg, dont les neurones GABAergiques ciblent les neurones DA de la VTA, peut induire la suppression de l'activité spontanée de neurones DA de la VTA (Lecca et al., 2012). L'activation des GABA_BR par le

baclofène (agoniste des GABA_BR) hyperpolarise les dendrites des neurones DA et chez un neurone ayant précédemment une décharge phasique, induit une décharge tonique (Seutin et al., 1994). Enfin, l'inhibition de l'activité des neurones GABAergiques de la VTA désinhibe les neurones DA (Bocklisch et al., 2013 ; Xia et al., 2011).

ii. *Modes de régulations intrinsèques*

Les autorécepteurs D₂ et D₃

Parmi les récepteurs à la dopamine, seuls les récepteurs D₂ et D₃ sont exprimés par les neurones DA et sont ainsi des « autorécepteurs ». Les autorécepteurs D₂R sont localisés au niveau présynaptique sur les terminaisons axonales, ainsi que dans le compartiment somato-dendritique (Ford, 2014). Deux isoformes des D₂R sont générés par épissage alternatif : une forme longue (D_{2L}) et une forme courte (D_{2S}). D_{2S} est l'isoforme principalement exprimé au niveau pré-synaptique, mais les deux sous-types (L et S) peuvent être des autorécepteurs (Ford, 2014). Puisqu'ils sont couplés à une protéine Gα_{i/o}, l'activation de ces récepteurs inhibe l'adénylate cyclase et réduit l'activité PKA (Figure 8) (Beaulieu and Gainetdinov, 2011). Ainsi, **aux terminaisons axonales**, ces autorécepteurs possèdent un rôle de rétrocontrôle négatif sur la transmission DA en diminuant l'activité de la TH (Dunkley and Dickson, 2019 ; Lindgren et al., 2001) et en promouvant celle du DAT (Cass and Gerhardt, 1994 ; Ford, 2014). De plus, les autorécepteurs D₂R peuvent moduler l'activité des canaux calciques et potassiques dépendants du voltage, et diminuer la probabilité de libération vésiculaire (Ford, 2014). Au niveau **somato-dendritique**, les autorécepteurs D₂ sont préférentiellement exprimés par les neurones DA de la VTA qui ciblent le NAcc (Lammel et al., 2008). Au sein des neurones DA, ils peuvent activer des canaux potassiques GIRK, canaux médiant un courant hyperpolarisant (« *inwardly rectifying conductance* ») (Ford, 2014). Par ailleurs, la dopamine libérée dans la VTA produit au sein des neurones DA des courants inhibiteurs médiés par les autorécepteurs D₂R. Puisque la présence de dextran, utilisé pour altérer la diffusion des molécules, ne change pas la cinétique des courants inhibiteurs médiés par les autorécepteurs D₂R en réponse à une libération de dopamine extracellulaire, ces récepteurs pourraient être localisés à proximité du site d'exocytose somato-dendritique (Ford et al., 2010). Ainsi, les autorécepteurs D₂R présents au niveau du soma et des dendrites régulent l'excitabilité neuronale. Les autorécepteurs D₃R des neurones DA de la VTA présentent une grande homologie structurelle avec les autorécepteurs

D₂R (Le Foll et al., 2014). Comme les autorécepteurs D₂R, ce sont des GPCR inhibant l'adénylate cyclase et induisant une réduction de la production d'AMPc (Chio et al., 1993). Leur expression est néanmoins moindre, et dans les neurones DA, semble se cantonner à une présence extra-synaptique, préférentiellement somato-dendritique (Beaulieu and Gainetdinov, 2011 ; Diaz et al., 2000, 1995). Ainsi, ils exercent principalement un rôle de contrôle de l'activité neuronale des cellules DA de la VTA, plutôt qu'une régulation de la signalisation DA au niveau présynaptique (Diaz et al., 2000).

Les canaux calciques, potassiques et HCN impliqués dans le contrôle de la décharge des neurones DA

La signalisation calcique dans les neurones DA du mésencéphale est permise par l'expression de **canaux calciques dépendants du voltage** (« *voltage-gated calcium channels* », VGCCs). Il en existe cinq types, dont les VGCCs de type-L (LTCCs, ou Ca_v1) qui sont très largement exprimés dans le cerveau, notamment les isoformes Ca_v1.2 et Ca_v1.3 (Nunes and Addy, 2023). Chez le rat, l'ouverture des canaux de type-L promeut le clivage de la protéine kinase C (PKC) en son fragment protéolytique (PKM), qui, par l'intermédiaire de ses cibles, provoque la décharge en bursts des neurones DA de la VTA (Liu et al., 2007). Ainsi, le calcium, par son rôle dans l'excitabilité cellulaire, est un modulateur important de l'activité des neurones DA de la VTA. Le calcium permet également l'activation des canaux potassiques à faible conductance, les **canaux SK**. L'utilisation de bloqueurs des canaux SK altère la régularité des AP et promeut la décharge en bursts des neurones DA de la VTA (Iyer et al., 2017 ; Overton and Clark, 1997 ; Waroux et al., 2005). Ainsi, les canaux SK contrôlent la précision temporelle et le type de décharge (régulier *versus* irrégulier, en bursts) (Iyer et al., 2017 ; Overton and Clark, 1997). Un autre courant impliqué dans la régulation de l'activité des neurones DA du mésencéphale est le courant *I_h*, médié par les **canaux HCN** (« *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated* »), des canaux cationiques non-sélectifs perméables au potassium et au sodium (He et al., 2014 ; White et al., 2006). Les canaux HCN sont portés par les neurones de la VTA, au niveau du soma et des dendrites (He et al., 2014). Ils sont activés suite à une hyperpolarisation, et sont importants dans le contrôle du potentiel membranaire de repos, la rythmicité de la décharge en AP (activité pacemaker), l'intégration des inputs excitateurs et ils

médient certains phénomènes de plasticité synaptique à court et long terme (He et al., 2014 ; Mercuri et al., 1995).

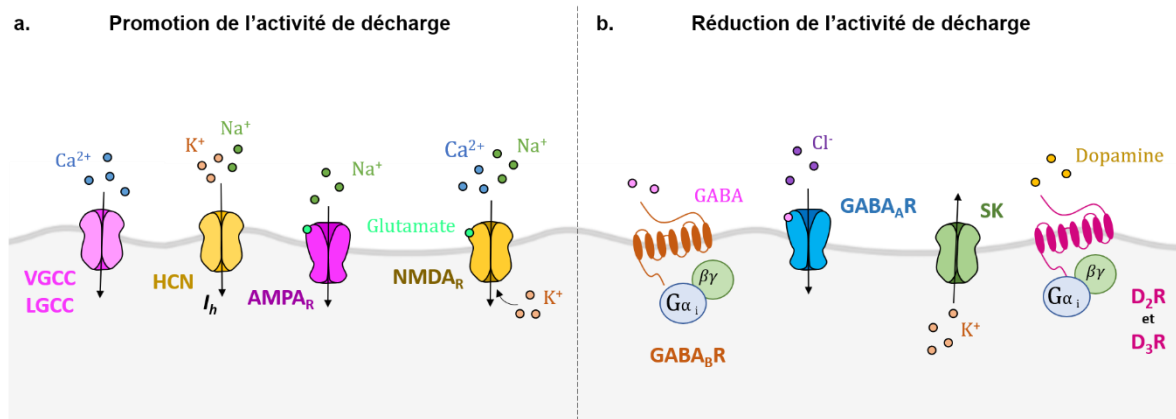


Figure 16. Schéma résumant les principaux récepteurs et canaux régulant l'activité des neurones dopaminergiques (DA) de la VTA. (a) Les canaux dont l'activation promeut l'activité de décharge des neurones DA, voire l'inhibe. VGCC : canaux calciques dépendants du voltage ; LGCC : VGCCs de type-L ; HCN : canal cationique non sélectif activé par l'hyperpolarisation et modulé par des nucléotides cycliques ; AMPA_R : récepteur AMPA ; NMDA_R : récepteur NMDA ; GABA_BR : récepteur GABA_A ; GABA_AR : récepteur GABA_A ; SK : canaux potassiques à faible conductance activés par le calcium ; D₂R et D₃R : auto-récepteurs dopaminergiques

Pour conclure, la VTA est une structure très hétérogène, au cœur d'un réseau neuronal dense. Les neurones DA qu'elle contient reçoivent de multiples afférences provenant de plusieurs régions cérébrales distinctes. Ces « inputs », qu'ils soient excitateurs, inhibiteurs ou modulateurs, régulent leur décharge. La connectivité des neurones DA, ainsi que leurs propriétés intrinsèques, contrôlent leur mode de décharge (régulière / en bursts), et influence les niveaux de dopamine libérés au sein des structures cibles. Les projections axonales des neurones DA de la VTA ont trois cibles principales : le PFC, le NAcc et l'amygdale. La VTA, les régions cérébrales qui la ciblent ainsi que celles vers lesquelles elle projette ses axones DA, ensemble, médient des fonctions cognitives complexes comme notamment la prise de décision, la mémoire de travail ainsi que les mécanismes de récompense et d'aversion. Etant donné le rôle central des neurones DA de la VTA dans ces fonctions, des altérations de leur activité et de leur connectivité peuvent avoir des conséquences majeures sur le fonctionnement cérébral.

II. La microglie, les macrophages résidents du système nerveux central

Du grec *γλία* (*glía*) qui signifie « colle », la glie a été historiquement définie comme une entité distincte de la population neuronale, formant une matrice autour de cette dernière exerçant un rôle de soutien (Jacobson and Rao, 2005 ; Prinz et al., 2019 ; Sierra et al., 2016). Les cellules de la microglie se distinguent des autres cellules gliales (astrocytes et oligodendrocytes) de par leur origine mésodermale, et présentent une grande hétérogénéité de distribution au sein du système nerveux central (SNC), de profils d'expression génétique et transcriptomique, et également de morphologies. Cette hétérogénéité reflète les multiples fonctions qu'elles assurent au sein du SNC, en conditions physiologiques et pathologiques, au cours du développement et de la vie adulte.

1. Aspects historiques de l'étude de la microglie

Au 19^{ème} siècle, Gluge et Virchow identifient au sein du SNC des cellules capables de phagocyter (engloutir puis lyser) du matériel membranaire (« *fatty substances* ») (Tremblay and Sierra, 2014). En 1919, Pío del Río-Hortega est le premier à décrire la glie comme étant constituée de trois types cellulaires : les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie (Sierra et al., 2016). Dès lors, la microglie est étudiée et est retrouvée dans toutes les structures cérébrales à des densités variées. Elle est plus abondante dans la matière grise, près des corps cellulaires neuronaux (Sierra et al., 2016). Le nom de ces cellules provient de leur morphologie : un soma de petite taille, sensiblement plus petit que celui des neurones, qui est formé d'un petit noyau entouré d'une fine couche cytoplasmique (Sierra et al., 2016). Les prolongements cellulaires de la microglie peuvent présenter divers agencements structurels (Sierra et al., 2016) (Figure 17). Pío del Río-Hortega note qu'en réponse à des conditions physiologiques et pathologiques

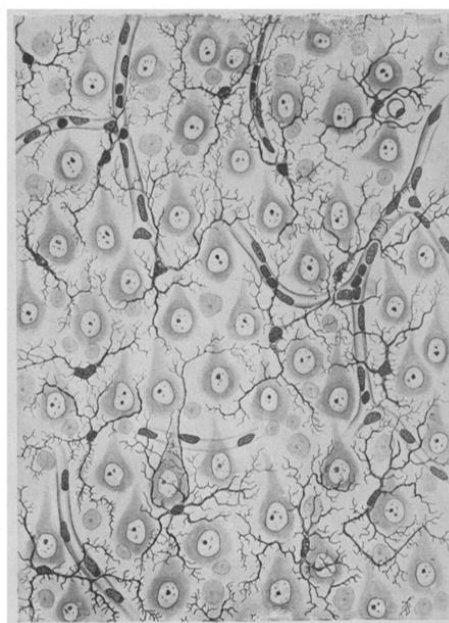


Figure 17. Dessin de Pío del Río-Hortega illustrant la distribution de la microglie au sein du cortex cérébral chez le lapin. Les cellules microgliales sont retrouvées proches des vaisseaux sanguins et des neurones, et présentent une grande variété de morphologies (Sierra et al., 2016)

particulières, ces prolongements présentent des changements structurels importants (Sierra et al., 2016). Les cellules microgliales sont capables de mouvements translationnels par lesquels elles se déplacent (Sierra et al., 2016). La motilité de la microglie au sein du tissu ainsi que ses fonctions de phagocytose sont identifiées dès les années 1930 (Tremblay and Sierra, 2014). Dans les années 1960, Blinzinger & Kreutzberg étudient les mécanismes de régénération axonale chez le rat et découvrent que la microglie proche du corps cellulaire de neurones moteurs répond à l'excision d'un nerf fascial (Blinzinger and Kreutzberg, 1968). En effet, les cellules microgliales prolifèrent lors de la phase initiale de la régénération du nerf, et défont certains contacts synaptiques formés entre les motoneurones et leurs afférences (« *synaptic stripping* ») (Blinzinger and Kreutzberg, 1968 ; Kreutzberg, 1996). Cette implication de la microglie dans la régénération neuronale constitue une première preuve de son potentiel **neuroprotecteur** (Tremblay and Sierra, 2014). La microglie est aussi capable de **phagocyter** les débris cellulaires (Kreutzberg, 1996). Il est désormais établi que les cellules microgliales participent au remodelage des afférences synaptiques, en les déplaçant (Blinzinger and Kreutzberg, 1968) et / ou en les supprimant par phagocytose (Paolicelli et al., 2011 ; Paolicelli and Ferretti, 2017 ; Schafer et al., 2012). Plus généralement, l'activité de la microglie est impliquée dans le développement normal et pathologique du système nerveux (Paolicelli and Ferretti, 2017), fonction qui sera détaillée dans les paragraphes suivants.

2. Origine embryonnaire et colonisation du système nerveux central

1) Une origine mésodermale

Les cellules microgliales sont les macrophages résidents du SNC. L'origine de ces cellules est longtemps restée incertaine, certaines études suggérant que les progéniteurs de la microglie étaient issus de l'ectoderme, d'autres au contraire qu'ils étaient d'origine mésodermale. Aujourd'hui, il est établi que la microglie dérive de progéniteurs microgliaux provenant de la couche mésodermale du sac vitellin – une annexe extra-embryonnaire qui contient des cellules hématopoïétiques, contrairement à la macroglie (astrocytes et oligodendrocytes) qui est issue de progéniteurs neuro-ectodermiques (Alliot et al., 1999 ; Ginhoux et al., 2010 ; Sierra et al., 2016). Chez la souris, la suppression de l'expression de PU.1, un facteur de transcription spécifique aux cellules hématopoïétiques, démontre bien cette origine mésodermale de la microglie puisqu'elle empêche le développement des macrophages,

et déplete les cellules microgliales du SNC (Kierdorf et al., 2013 ; McKercher et al., 1996). Au cours du développement prénatal, les progéniteurs hématopoïétiques, dont sont issus en particulier les macrophages résidents des tissus, sont formés lors de deux stades développementaux distincts : un premier au sein du sac vitellin (hématopoïèse primitive, avant E8 chez la souris) et, un second dans le foie foetal (hématopoïèse définitive, vers E10.5-E12.5) (Ginhoux et al., 2010 ; Ginhoux and Merad, 2011) (Figure 18). Le cerveau est le premier organe embryonnaire colonisé par les macrophages (en fait, les précurseurs des microglies) au cours du développement (Sorokin et al., 1992). En 2010, Ginhoux et *al.* ont montré que la majeure partie de la microglie résidente du SNC est issue de la première génération de progéniteurs provenant du sac vitellin (Ginhoux et al., 2010). De plus, le développement microglial ne dépend pas de MYB, un facteur de transcription essentiel pour la genèse de certains macrophages en dehors du cerveau (Kierdorf et al., 2013). En effet, des souris *knock out* pour MYB (*Myb*^{-/-}) ne présentent pas d'altération de la densité microgliale mais une déficience en monocytes et macrophages dans différents tissus (Kierdorf et al., 2013 ; Nayak et al., 2014 ; Schulz et al., 2012). Ces observations suggèrent que des progéniteurs distincts de macrophages et de cellules microgliales co-existent (Schulz et al., 2012) (Figure 18).

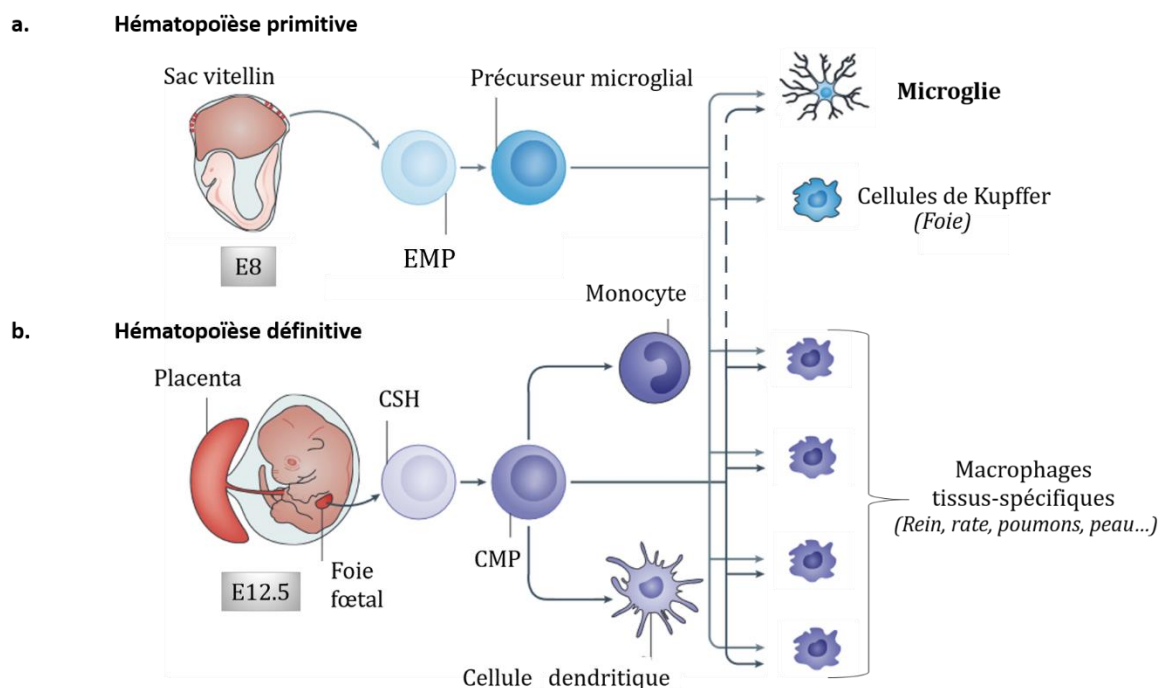


Figure 18. Hématopoïèse primitive et définitive, sources de macrophages tissu-spécifiques.

Alors que l'hématopoïèse primitive prend place dans le sac vitellin vers le jour embryonnaire 8 (E8), au cours du développement l'hématopoïèse définitive a lieu dans le foie foetal vers E12.5. CSH : cellule souche hématopoïétique ; CMP : cellule myéloïde progénitrice. EMP : progéniteur érythroblastique.

Adaptée de Prinz et Priller (2014)

2) Du sac vitellin au cerveau adulte

i. Migration du sac vitellin au SNC en développement

Entre E7 et E9, les premiers progéniteurs hématopoïétiques sont observés chez l'embryon de souris dans le sac vitellin (Ginhoux et al., 2010). Les précurseurs microgliaux migrant vers le SNC ont une morphologie dite amiboïde (Sierra et al., 2016) : ils présentent peu ou pas de prolongements cellulaires, et c'est lors de leur maturation qu'ils acquièrent la forme cellulaire ramifiée, considérée comme représentative d'un état mature et de repos / de surveillance. La migration des précurseurs microgliaux dans le cerveau en développement s'effectue en plusieurs vagues, en fonction des structures cérébrales qui les accueillent (Chan et al., 2007 ; Smolders et al., 2019). Une première vague de colonisation débute à E8.5 chez la souris (Ginhoux et al., 2010 ; Kierdorf et al., 2013 ; Reemst et al., 2016 ; Schulz et al., 2012) (Figure 18). Entre E9 et E10.5, des précurseurs microgliaux, identifiés par l'expression du récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase CSF-1 (« *colony stimulating factor-1 receptor* », CSF-1_R), qui intervient dans le contrôle de la différenciation des macrophages, atteignent le cerveau en développement (Ginhoux et al., 2010). Chez l'humain, certains d'entre eux, détectés par le marqueur Iba1 (« *ionized calcium-binding adapter molecule 1* » ou « *allograft inflammatory factor 1* », AIF-1), sont observés dès 4.5 spf le long de la surface piaie, près de vaisseaux sanguins (Monier et al., 2007 ; Verney et al., 2001). La seconde vague de colonisation du parenchyme cérébral se produit entre E12.5 et E16 (De et al., 2018 ; Reemst et al., 2016 ; Smolders et al., 2019). Cette seconde vague de migration a été mise en évidence par les travaux de De et al. qui ont remarqué l'existence de deux populations microgliales au sein du SNC : celle qui expriment Hoxb8 (Hoxb8⁺) et celle qui ne l'expriment pas (Hoxb8⁻) (De et al., 2018). La microglie Hoxb8⁺ serait issue d'une seconde vague de colonisation du cerveau, qui partirait du sac vitellin, et passerait par le foie fœtal avant d'atteindre le SNC vers E12.5 (De et al., 2018). Lors de cette seconde phase, le nombre de cellules microgliales amiboïdes au sein du parenchyme cérébral augmente drastiquement (Smolders et al., 2019 ; Swinnen et al., 2013). Entre E16 et E18, cette densité continue modérément d'augmenter (Smolders et al., 2019 ; Swinnen et al., 2013). Les mécanismes par lesquels les cellules microgliales, originaires du sac vitellin, trouvent leur chemin jusqu'au SNC ne sont pas encore parfaitement compris. Une revue récente propose plusieurs mécanismes hypothétiques qui seraient susceptibles de guider

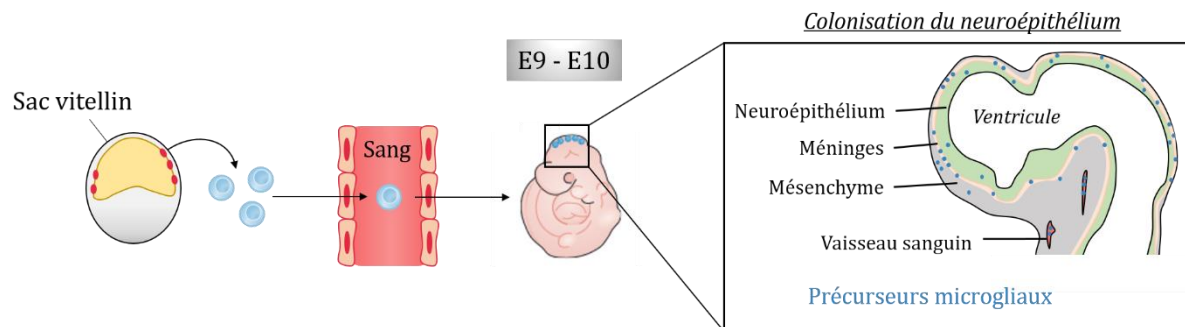


Figure 19. Les progéniteurs issus du sac vitellin empruntent le système vasculaire afin de rejoindre le cerveau en développement.

Adaptée de Ginhoux & Prinz (2015), Pont-Lezica et al. (2011) et Sorokin et al. (1992)

les microglies immatures au cours de leur migration (Hattori, 2022). Cette revue insiste notamment sur les interactions entre la vascularisation de l’embryon et la colonisation du SNC par la microglie. En effet, la prolifération des progéniteurs microgliaux au sein du sac vitellin intervient juste avant l’angiogenèse (Walls et al., 2008). Bien qu’à E8 chez la souris, le système vasculaire soit encore primitif (Walls et al., 2008) et qu’à E11 chez le rat, la circulation sanguine soit toute juste mise en place (Sorokin et al., 1992), les cellules amiboïdes pourraient profiter de la vascularisation de l’embryon pendant leur migration pour atteindre leur cible cérébrale (Ginhoux et al., 2010 ; Hattori, 2022) (Figure 19). Cette hypothèse est notamment corroborée par l’observation que des souris *knock out* pour le gène *Ncx1*, nécessaire à l’établissement d’un système vasculaire fonctionnel, présentent des défauts de migration des précurseurs microgliaux (Ginhoux et al., 2010 ; Koushik et al., 2001).

ii. Entrée au sein du SNC en développement

Les mécanismes moléculaires et les voies empruntées qui déterminent la localisation finale des microglies au sein du SNC ne sont pas parfaitement compris (Smolders et al., 2019). Néanmoins, plusieurs études indiquent que l’entrée de la microglie dans le futur SNC intervient quelques jours seulement après la neurulation (E8.5 chez la souris, voir **I.1.1**) (Copp, 2005) et pendant la neurogénèse, lorsque les destins cellulaires se définissent (entre E10 et E14, voir **I.1.2**)ii.) (Hegarty et al., 2013). En effet, la neurogénèse débute entre E9.5 et E12 chez la souris, et à la fin du premier trimestre – début du second trimestre de grossesse (entre 10 et 13 spf) chez l’humain (Chan et al., 2007 ; Monier et al., 2007 ; Prinz and Priller, 2014 ; Verney et al., 2010). A E11.5, la microglie colonise la moelle épinière (Rigato et al., 2011). L’entrée des précurseurs microgliaux dans le cerveau semble pouvoir se faire via les méninges, par les

ventricules et via le plexus choroïde de l'éminence thalamique (Menassa and Gomez-Nicola, 2018 ; Smolders et al., 2019 ; Swinnen et al., 2013) (Figure 19). Les précurseurs microgliaux commencent à envahir le cortex vers E10.5 – E11.5 chez la souris, et leurs densités aux alentours et au sein du parenchyme cérébral augmentent progressivement jusqu'à E14.5 (Swinnen et al., 2013). A E13 chez le rat, la vascularisation du cerveau s'établit et des précurseurs microgliaux sont observés au sein des vaisseaux sanguins nouvellement formés (Sorokin et al., 1992). La densité en cellules microgliales au sein du parenchyme cérébral continue d'augmenter après E15.5 et jusque E17.5 chez la souris (Reemst et al., 2016 ; Smolders et al., 2019 ; Swinnen et al., 2013).

iii. Dispersion au sein du SNC en développement

Une fois entrées dans le SNC, les cellules microgliales amiboïdes s'accumulent le long des ventricules, au niveau de la zone ventriculaire (« *ventricular zone* », VZ) et sous les méninges, dans la zone marginale (« *marginal zone* », MZ) (Menassa and Gomez-Nicola, 2018 ; Swinnen et al., 2013 ; Verney et al., 2010) (Figure 19). A mesure que la plaque corticale s'étend et s'épaissit, les cellules microgliales gagnent du territoire (Menassa and Gomez-Nicola, 2018). La microglie amiboïde migre d'abord tangentiellement puis radialement. Par son déplacement tangentiel, elle longe la surface du SNC et se disperse de la partie rostrale à la partie caudale du fœtus. Puis, elle s'infiltré dans le tissu, en profondeur, de manière radiale (Navascués et al., 2000 ; Pont-Lezica et al., 2011 ; Smolders et al., 2019 ; Verney et al., 2010). Au sein du cerveau fœtal, le déplacement des cellules microgliales serait guidé par les vaisseaux sanguins et plus spécifiquement par les cellules périvasculaires (les péricytes) qui sécrètent la chimiokine ligand C-X3-C1 (CX3CL1) ainsi que de l'adénosine triphosphate (ATP) (Hattori, 2022). Les cellules microgliales, exprimant le récepteur de CX3CL1, CX3CR1 (ou fractalkine) et les récepteurs purinergiques P2RY12 qui lient l'ATP, détectent ce signal et longent les vaisseaux sanguins établis jusqu'à leur région cible (Hattori, 2022 ; Mondo et al., 2020) (Figure 20a). La microglie est ainsi particulièrement proche des vaisseaux sanguins pendant leur pic de colonisation du SNC (Mondo et al., 2020). Les péricytes ne sont pas les seules cellules à sécréter ces facteurs et à guider la microglie dans sa migration. Les cellules neuronales déjà en place dans l'embryon, dont certaines sont apoptotiques (notamment au niveau du plexus choroïde), semblent intervenir dans ce processus (Swinnen et al., 2013). Elles peuvent notamment sécréter, tout comme les péricytes, du CX3CL1 et de l'ATP (Elliott et al., 2009 ; Hattori, 2022 ; Mondo

et al., 2020 ; Smolders et al., 2019 ; Swinnen et al., 2013) (Figure 20b). Les progéniteurs de la zone ventriculaire sécrètent, eux aussi, des molécules pouvant attirer les cellules microgliales. Dans le cortex cérébral en développement, le recrutement de la microglie dépend de la signalisation entre la chimiokine de type CXC 12 (CXCL12, aussi appelée « *stromal cell-derived factor 1* », SDF-1) et de ses récepteurs CXCR4 / CXCR7 (Arnò et al., 2014). Enfin, certaines études suggèrent que la microglie pourrait utiliser la matrice extracellulaire et la glie radiaire afin de se mouvoir au sein du SNC (Pont-Lezica et al., 2011 ; Rigato et al., 2011) (Figure 20c-d). De plus, certains progéniteurs microgliaux, encore mobiles, expriment fortement des métalloprotéinases matricielles (MMP), *Mmp8* et *Mmp9*, qui permettent des modifications de la matrice extracellulaire (Kierdorf et al., 2013). L'application d'inhibiteurs de ces MMP diminue la distribution des microglies embryonnaires (Kierdorf et al., 2013).

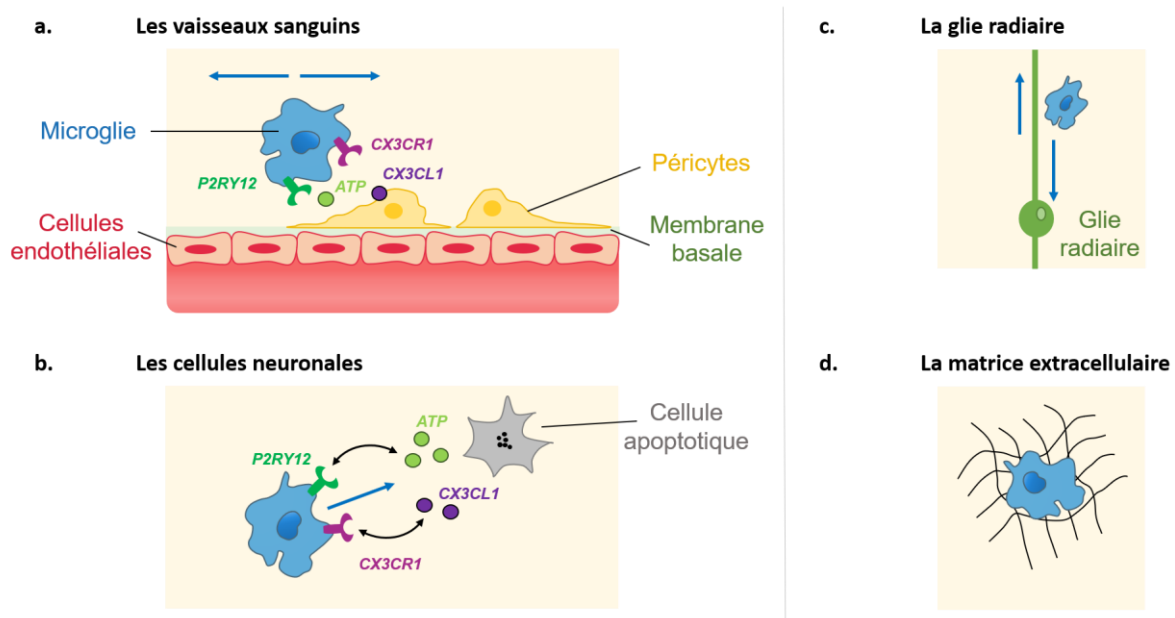


Figure 20. Dessins schématiques illustrant certains des acteurs et types cellulaires participant à la régulation de la migration des cellules microgliales au sein du SNC en développement. CX3CL1 : chimiokine ligand C-X3-C1 ; CX3CR1 : récepteur de CX3CL1 ; ATP : adénosine triphosphate ; P2RY12 : récepteur purinergique. Les flèches bleues illustrent le mouvement de la microglie. Les flèches noires illustrent les signalisations ligands/récepteurs.

Adaptée de Hattori et al. (2022)

Ainsi, les progéniteurs microgliaux colonisent le cerveau avant la mise en place de la barrière hémato-encéphalique (BHE), ils s'y dispersent et y prolifèrent avant de se différencier *in situ*.

iv. Différenciation, prolifération et maturation

Les progéniteurs microgliaux sont générés pendant les deux premières semaines de gestation et ces cellules, issues du sac vitellin, migrent jusqu'au cerveau en développement où elles prolifèrent et se différencient en microglie adulte (Alliot et al., 1999). En effet, alors qu'à E18 chez la souris, la population microgliale ne représente que 1,7% des cellules cérébrales, à l'âge adulte, elle en constitue entre 10 et 13%. Pourtant à E18, la barrière hémato-encéphalique est déjà fonctionnelle (Ben-Zvi et al., 2014 ; Blanchette and Daneman, 2015). Ces résultats ont permis d'établir que le pool de cellules microgliales originaires du sac vitellin, colonise le SNC puis y prolifère dans le cerveau de l'embryon et chez le nouveau-né (Alliot et al., 1999). Entre E10.5 et la naissance, le nombre de microglie augmente de 40 à 80% (Kierdorf et al., 2013 ; Tay et al., 2017b). Le pouvoir mitotique des cellules microgliales amiboïdes – immatures – est important, mais diminue au fur et à mesure de leur maturation (Navascués et al., 2000).

La prolifération, la différenciation et la maturation des cellules de la microglie sont permises par l'expression de plusieurs facteurs de transcription (Figure 21).

Tout d'abord, lors du développement des progéniteurs microgliaux, l'expression de **PU.1** est requise (Beers et al., 2006 ; McKercher et al., 1996 ; Tay et al., 2017). Chez la souris, sa déplétion dès le stade embryonnaire supprime le développement des progéniteurs du sac vitellin (hématopoïétiques et microgliaux). L'embryon se trouve ainsi dépourvu de macrophages matures, et de cellules microgliales (Beers et al., 2006 ; McKercher et al., 1996 ; Tay et al., 2017). Le *knock out* de PU.1 chez la souris n'est pas létal, cependant les nouveaux nés décèdent dans les 48 heures par septicémie (McKercher et al., 1996).

IRF8 (« *interferon regulatory factor 8* ») est un facteur de transcription dont l'expression est stimulée par IFN- γ (« *interferon- γ* ») et qui est constitutivement exprimé par la microglie (Minten et al., 2012). Le *knock-out* d'IRF8 chez la souris (IRF8^{-/-}) réduit significativement la densité de cellules microgliales embryonnaires au sein du mésencéphale et plus généralement au sein du SNC, tout en augmentant le nombre de cellules en apoptose. La densité de cellules microgliales au sein du SNC des souris IRF8^{-/-} demeure altérée après la naissance (Kierdorf et al., 2013). Au contraire, Minten et al. ont observé une augmentation du nombre de cellules microgliales au sein du cortex et du cervelet chez les souris IRF8^{-/-}. Cette augmentation s'accompagne d'une altération de leur morphologie : elles présentent peu de

prolongements cytoplasmiques, un faible degré de ramifications et donc de complexité. De ce fait, le volume cérébral occupé par chacune des cellules IRF8^{-/-} est réduit (Minten et al., 2012). Ces deux études, bien qu'ayant des résultats différents, suggèrent que IRF8 est nécessaire au développement normal des cellules microgliales (survie des progéniteurs, morphologie et nombre). De façon intéressante, Kierdorf et al. ont observé que le *knock down* de **PU.1**, par l'utilisation d'un shRNA (« *short hairpin RNA* »), induit une diminution de l'expression de IRF8 (Kierdorf et al., 2013). Ces deux facteurs peuvent agir indépendamment l'un de l'autre mais également s'hétéro-dimériser (PU.1 agissant en amont de IRF8) et, ensemble, induire des effets ciblés (Kierdorf et al., 2013 ; Taniguchi et al., 2001).

RUNX1 (« *runt-related transcription factor 1* ») est un facteur de transcription qui intervient dans la différenciation et la prolifération des cellules hématopoïétiques (Friedman, 2009 ; Kierdorf et al., 2013 ; Tay et al., 2017). Le *knock-down* de RUNX1 diminue l'expression de IRF8, tout comme le fait un shRNA ciblant PU.1 (Kierdorf et al., 2013). L'expression de RUNX1 se maintient jusqu'à la maturation microgliale (environ 10 jours après la naissance), suggérant un rôle important de ce facteur dans les mécanismes permettant la transition d'une microglie amiboïde, immature, à une microglie ramifiée, mature (Tay et al., 2017 ; Zusso et al., 2012). De plus, RUNX1 régule la prolifération des cellules amiboïdes ayant atteint le SNC, notamment via une boucle de rétrocontrôle impliquant **PU.1**, et ainsi permet l'établissement d'une densité microgliale suffisante au développement du cerveau adulte (Jin et al., 2012 ; Zusso et al., 2012).

Enfin, l'expression de **CSF-1_R** est maintenue tout au long du développement et le *knock-out* pour ce récepteur (CSF-1_R^{-/-}), chez la souris, altère le développement des cellules microgliales causant leur absence au sein du SNC (Erblich et al., 2011 ; Ginhoux et al., 2010). CSF-1_R a deux ligands potentiels dans le cerveau, le plus exprimé étant l'**interleukine 34** (IL-34) et le second, **CSF-1** (Greter et al., 2012 ; Wei et al., 2010). Alors que l'IL-34 est produite par les neurones, CSF-1 est issu d'une expression astrocytaire, oligodendrocytaire et microgliale (Barca et al., 2021 ; Wang et al., 2012). Dans un modèle présentant une suppression de l'expression de CSF-1 (CSF-1^{op/op}), la densité microgliale est altérée (Ginhoux et al., 2010 ; We et al., 1998). CSF-1 est donc nécessaire au développement normal de la microglie. Cependant, des cellules microgliales demeurent, suggérant une compensation de l'IL-34 et ainsi, la contribution d'IL-34 à l'homéostasie microgliale (Ginhoux et al., 2010 ; Greter et al., 2012). Par ailleurs, des souris dépourvues d'IL-34 naissent sans microglie (Wang et al., 2012).

L'IL-34 et CSF-1 sont ainsi considérés comme ayant des fonctions distinctes mais complémentaires (Easley-Neal et al., 2019).

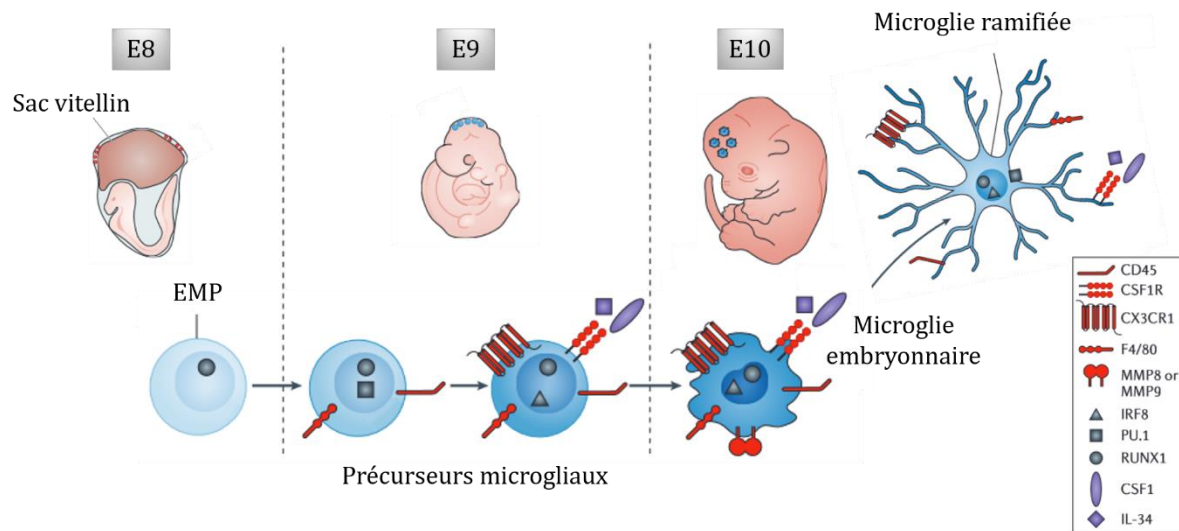


Figure 21. Développement embryonnaire et post-natal de la microglie. Plusieurs récepteurs aux cytokines (symboles rouges), facteurs de transcription (symboles noirs) et cytokines (symboles violets) sont nécessaires au développement embryonnaire et post-natal des cellules microgliales. EMP : progéniteurs érythroblastiques.

Adaptée de Prinz et Priller (2014)

Chez l'humain, la migration et la maturation des cellules microgliales semblent nécessiter les mêmes molécules (Verney et al., 2010). La maturation de la microglie continue tout au long de la vie prénatale. C'est seulement peu avant la naissance que des cellules microgliales différenciées et ramifiées, c'est-à-dire pourvues de caractéristiques « matures », sont observées dans le cerveau humain (Ginhoux and Prinz, 2015 ; Verney et al., 2010).

3) Distribution au sein du système nerveux central

En conditions physiologiques, la distribution des cellules microgliales au sein des différentes aires cérébrales évolue au cours du développement. La microglie continue à proliférer après la naissance chez le rongeur et la majorité des cellules microgliales formées à ce stade sont générées au cours des deux premières semaines de vie post-natale (Alliot et al., 1999 ; Pont-Lezica et al., 2011).

i. Au cours du développement

La distribution précoce des progéniteurs microgliaux dépend de leur zone d'entrée dans le SNC. Ils sont localisés de manière prédominante au niveau de l'épithélium neural et dans la partie rostrale du cerveau embryonnaire (Sorokin et al., 1992). Chez le rat, entre E12 et E13, les territoires cérébraux occupés par la microglie s'étendent caudalement le long du tube neural (Sorokin et al., 1992). A E15 chez la souris, les cellules microgliales sont principalement observées dans la zone sous-ventriculaire (SVZ, pour « *sub-ventricular zone* ») et la VZ, et plus rarement au niveau de la plaque corticale (Cserép et al., 2022). **A E16 chez la souris**, les progéniteurs microgliaux se regroupent en point de grande densité cellulaire (« *hot spots* ») principalement présents dans la matière blanche (Perry et al., 1985). Rares sont les cellules amiboïdes présentes dans la matière grise à ce stade développemental (Perry et al., 1985). **A E19 chez la souris**, le nombre de progéniteurs microgliaux a largement augmenté, mais les « *hot spots* » restent définis. Certaines cellules au sein de ces points de grande densité cellulaire présentent une morphologie s'éloignant de la forme amiboïde pour se rapprocher d'une forme ramifiée. En parallèle, le nombre de progéniteurs neuronaux en mort cellulaire augmente, notamment dans le mésencéphale. Ces cellules, reconnaissables à leur pycnose (condensation du noyau), se retrouvent entourées de progéniteurs microgliaux (Perry et al., 1985). **A la naissance**, le cerveau murin présente des cellules microgliales ramifiées, c'est-à-dire plus matures, dans la plupart des régions cérébrales, mais cette distribution est très hétérogène. Des points de grande densité cellulaire sont toujours observables (Perry et al., 1985). Dix jours **après la naissance (P10) chez la souris**, les aires cérébrales se spécifient. La microglie est, à ce stade, présente à la fois au sein des matières blanche et grise (Perry et al., 1985). Chez le rat, alors qu'à P7 des cellules amiboïdes sont encore présentes à de fortes densités au niveau des « *hot spots* », elles ont disparu à P17, remplacées par des cellules microgliales matures (ou en cours de maturation, car certaines sont encore peu ramifiées) (Ashwell, 1991). Peu d'études ont examiné spécifiquement l'établissement des microglies au sein du mésencéphale. La densité de cellules microgliales dans cette structure connaît un pic des deuxièmes et troisièmes semaines de vie post-natale (entre P16 et P22) chez la souris, ce qui pourrait suggérer que la microglie joue un rôle important dans son développement (Hope et al., 2020) (Figure 22).

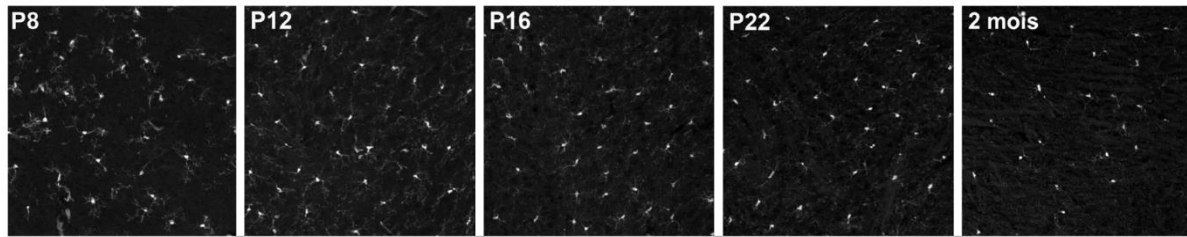


Figure 22. Images représentatives de la distribution des cellules microgliales (eGFP+) au sein de la VTA chez la souris (CX3CR1^{EGFP/+}) à P8, P12, P16, P22 et 2 mois. P : jour postnatal.

Adaptée de (Hope et al. 2020)

ii. Dans le cerveau adulte

Les cellules microgliales sont ubiquitaires dans **le cerveau adulte**, bien que, selon les régions étudiées, des différences de densité soient notables (Perry et al., 1985) (Figure 23). Chez la souris adulte, la microglie est davantage présente au sein de la substance grise (près des corps cellulaires) que dans la substance blanche (fibres) (Perry et al., 1985). Par ailleurs, la densité de la microglie est importante dans certaines régions comme l'HPC, le bulbe olfactif et la substance noire *reticulata* (SNr) mais est moindre au sein de la VTA (De Biase et al., 2017 ; Perry et al., 1985 ; Tan et al., 2020). Ainsi, la densité microgliale est trois fois plus grande au sein de la SNr que dans la VTA (De Biase et al., 2017). Le ratio du nombre de cellules microgliales sur le nombre de neurones avoisine 1 au sein de la SNr, et n'est que d'environ 0,2 pour la VTA (De Biase et al., 2017).

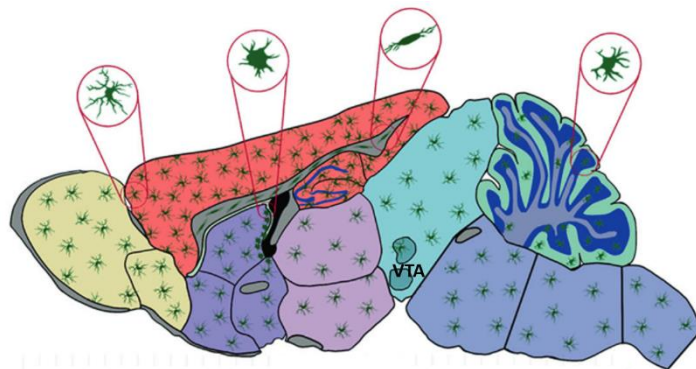


Figure 23. Distribution et morphologie hétérogènes des cellules microgliales au sein des structures cérébrales dans le cerveau murin adulte. Adaptée de Tan et al. (2020)

4) Renouvellement au cours de la vie

Comme nous l'avons indiqué précédemment, le pool de progéniteurs microgliaux originaire du sac vitellin qui s'établit au sein du SNC prolifère et s'y maintient non seulement pendant la période embryonnaire mais aussi après la naissance. Chez l'adulte, la microglie représente 10 à 13% des cellules cérébrales (Alliot et al., 1999) et sa densité au sein du cerveau se maintient à l'âge adulte et pourrait augmenter au cours du vieillissement (Edler et al., 2021).

i. En conditions physiologiques

Dans le but d'étudier si, en conditions physiologiques, le SNC recrute des macrophages périphériques afin de renouveler le pool cellulaire déjà établi, Ajami et al. ont utilisé la parabiose (Ajami et al., 2007). Le principe de cette technique est de fusionner les circulations sanguines de deux animaux, et d'étudier les échanges cellulaires entre les deux organismes. La première souris est transgénique et ses macrophages expriment la protéine fluorescente verte (« *green fluorescent protein* », GFP), l'autre souris est sauvage. Une dizaine de jours de parabiose suffit à induire un chimérisme sanguin. Après cinq mois, alors que le foie de la souris sauvage présente des macrophages exprimant la GFP (GFP+), son cerveau n'en est pas pourvu. Cette étude suggère que la maintenance microgliale, en condition physiologique, ne nécessite pas l'incorporation de nouveaux macrophages issus de la circulation sanguine (Ajami et al., 2007). Des travaux ultérieurs ont montré que le renouvellement de la microglie aux stades postnataux est indépendant des macrophages périphériques et, ont révélé que les progéniteurs microgliaux formés avant E7.5, venant coloniser le SNC, participent significativement à la population microgliale retrouvée au sein du cerveau murin adulte (Ginhoux et al., 2010). Basée sur les dynamiques de prolifération journalière, une étude de cartographie de destins cellulaires microgliaux a estimé que, chez la souris, la microglie s'auto-renouvelle complètement en 3 ans et 5 mois dans le cortex, 3 ans et 2 mois dans le mésencéphale et, 1 an et 3 mois dans l'hippocampe (Tay et al., 2017a). La région dans laquelle les cellules microgliales se renouvellent intégralement le plus rapidement est le bulbe olfactif (8 mois). En considérant la durée de vie moyenne de deux ans chez la souris, on peut conclure que les cellules microgliales du mésencéphale se renouvellent peu, tout comme celles du cortex.

Ainsi, la microglie est formée d'une population cellulaire dérivée du sac vitellin, qui présente une grande longévité mais qui est aussi capable de s'auto-renouveler, afin d'assurer l'homéostasie microgliale et tissulaire (Ginhoux and Prinz, 2015 ; Paolicelli et al., 2022).

ii. En conditions expérimentales, traumatiques et/ou pathologiques

Dans certaines conditions traumatiques ou pathologiques impliquant une neurodégénérescence, la densité en cellules microgliales au sein du SNC peut varier. Dès 1919, dans une étude réalisée chez le chat nouveau-né, Pío del Río-Hortega a remarqué que 24 heures suffisent aux cellules microgliales pour qu'elles migrent vers une zone du cerveau lésée par une incision, et que leur densité augmente au sein de l'hémisphère ciblé. Plusieurs décennies plus tard, Blinzinger et Kreutzberg ont observé qu'en réponse à la section d'un nerf fascial, les cellules microgliales avoisinant les motoneurons lésés prolifèrent (Blinzinger and Kreutzberg, 1968). A la différence de l'incision décrite par Pío del Río-Hortega, la section du nerf n'induit pas de dommage de la barrière hémato-encéphalique, et permet d'exclure que des macrophages externes au SNC soient impliqués dans l'accroissement de la densité microgliale. Plus récemment, Ajami et al. ont utilisé leur modèle de parabiose pour étudier si, dans ces conditions traumatiques et pathologiques, la microglie augmente sa densité par le recrutement de macrophages périphériques (Ajami et al., 2007). En utilisant un modèle de section du motoneurone facial, ils ont observé une microgliose (forte densité de cellules microgliales dont le soma est hypertrophié et les prolongements microgliaux rétractés) importante mais n'ont pas remarqué de contribution des cellules GFP+. De plus, aucune cellule microgliale GFP+ n'a été observée dans un modèle de parabiose avec altérations de la barrière hémato-encéphalique induite par irradiation (Ajami et al., 2007). Ce résultat a été confirmé par d'autres travaux montrant que, trois mois après une greffe de cellules hématopoïétiques chez un animal irradié, le cerveau de ce dernier contient toujours 95% de ses cellules microgliales d'origine (Ginhoux et al., 2010). Ainsi, une dégénérescence neuronale ne semble pas suffire à l'entrée de macrophages au sein du SNC, pas plus qu'une altération de la barrière hémato-encéphalique (Ajami et al., 2007; Ginhoux et al., 2010). Plus récemment, par des conditions expérimentales d'irradiation et de déplétion complète des cellules microgliales au sein du cerveau de souris âgées de quelques jours, Bruttger et al. ont observé une rapide repopulation du SNC par les cellules microgliales, dont certaines sont originaires de la moelle osseuse. A 12 semaines, ces cellules microgliales dérivées de la moelle osseuse – qui ne sont pas des monocytes – sont

toujours présentes au sein du cerveau de la souris, et semblent s'être installées de façon permanente afin de remplacer la microglie disparue (Bruttger et al., 2015).

3. Hétérogénéité des cellules microgliales

Plusieurs études déjà mentionnées montrent l'hétérogénéité de la population microgliale. Tout d'abord, deux populations microgliales ont été identifiées, dont l'une est composée de cellules Hoxb8+ et s'installe plus tardivement dans le cerveau (vers E12.5) (De et al., 2018). Localisée dans le cortex cérébral chez l'embryon, la microglie Hoxb8+ présente une distribution hétérogène au sein du cerveau adulte : les cellules microgliales Hoxb8+ représentent 61% de la microglie dans le cortex moteur M1/2 et, seulement 3% et 17% respectivement dans le VP et la substance noire *reticulata* (SNr) (De et al., 2018). Plusieurs études indiquent que la densité microgliale diffère selon les structures cérébrales étudiées (De Biase et al., 2017 ; Perry et al., 1985 ; Tan et al., 2020). A cette distribution hétérogène s'ajoute des cinétiques d'auto-renouvellement variées (Tay et al., 2017a). Il convient de noter qu'il n'existe pas de corrélation entre les cinétiques d'auto-renouvellement et la densité microgliale au sein de la structure. Par exemple, Tay et *al.* estiment que le renouvellement complet de la microglie au sein du cortex et de l'HPC nécessite respectivement 41 et 15 mois (Tay et al., 2017a), alors que, dans ces deux régions, la microglie est considérée dense (Tan et al., 2020). Dans le mésencéphale, la densité en microglie est moyenne (Tan et al., 2020), pour une cinétique de renouvellement lente (38 mois) comme dans le cortex (Tay et al., 2017).

L'hétérogénéité de la population microgliale se manifeste aussi par des différences transcriptomiques, épigénétiques, et morphologiques (Brioschi et al., 2020). Certaines études rapportent également une hétérogénéité dépendante des stades développementaux et du sexe.

1) Profils d'expression caractéristiques de la microglie

La microglie exprime certains marqueurs correspondant à l'expression de gènes requis pour leur différenciation, leur prolifération, leur maturation, leurs fonctions et leur survie. Ensemble, les niveaux d'expression de ces marqueurs constituent la carte d'identité des cellules microgliales. Selon le stade développemental, les régions cérébrales, l'état du tissu et les niveaux d'activation cellulaire, ces marqueurs sont plus ou moins exprimés, accentuant l'hétérogénéité de la population.

i. Marqueurs typiques des macrophages, exprimés par la microglie

Les cellules microgliales, en tant que macrophages résidents du SNC, expriment certains marqueurs protéiques typiques des macrophages et monocytes circulants (Tableau 1) :

Marqueurs	Gènes	Autres types cellulaires l'exprimant
ADGRE1 ou F4/80 (Adhesion G protein-coupled receptor E1)	<i>ADGRE1 (EMR1, TM7LN3)</i>	Monocytes, macrophages, cellules de Kupffer
C1R (Complement receptor 1)	<i>C1R</i>	Hépatocytes, cellules de Leydig, fibroblastes, cellules épithéliales...
CD11b (Integrin subunit alpha M) Forme un hétérodimère avec CD18 pour former CR3, le récepteur du complément 3	<i>ITGAM (CD11B, CR3A, MAC-1)</i>	Monocytes, macrophages, cellules de Kupffer, cellules <i>natural killer</i> ...
CD45 (Cluster of differentiation 45)	<i>PTPRC (CD45, GP180, LCA, T200)</i>	Monocytes, macrophages, cellules <i>natural killer</i> , cellules T, cellules B, cellules de Kupffer...
CD68 (Cluster of differentiation 68)	<i>CD68 (DKFZp686M18236, GP110, LAMP4, macrosialin, SCARD1)</i>	Monocytes et macrophages
CSF1R (colony stimulating factor 1 receptor)	<i>CSF1R</i>	Cellules neuronales, cellules épithéliales, glandulaires, macrophages, monocytes, cellules de Langerhans...
CX₃CR1 (fractalkine receptor ou C-X3-C motif chemokine receptor 1)	<i>CX3CR1 (CCRL1, CMKBRL1, CMKDR1, GPR13, V28)</i>	Monocytes, macrophages, cellules de Langerhans, cellules <i>natural killer</i> ...
DAP12 (CSF1 _R transmembrane adaptor protein)	<i>TYROBP (DAP12, KARAP, PLO-SL, PLOSL)</i>	Monocytes, macrophages, neutrophiles, cellules <i>natural killer</i> ...

Iba1 ou AIF1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1 ou allograft inflammatory factor 1)	<i>AIF1</i> (<i>AIF-1, IBA1, IRT-1, Em:AF129756.17</i>)	Monocytes, macrophages, cellules de Langerhans, cellules de Kupffer
TLR 3 et 4 (Toll-like receptors 3 and 4)	<i>TLR3 (CD283)</i> <i>TLR4 (ARMD10, CD284, hToll, TLR-4)</i>	Macrophages, cellules dendritiques, fibroblastes, cellules épithéliales, cellules de Schwann...
TREM2 (Triggering receptor expressed on myeloid cells 2)	<i>TREM2</i> (<i>TREM-2, Trem2a, Trem2b, Trem2c</i>)	Macrophages, cellules de Hofbauer (placenta)...

Tableau 1. Marqueurs non-spécifiques des cellules microgliales. Adapté de (De Biase et al., 2017b; Grabert et al., 2016 ; Hattori, 2022 ; Paolicelli et al., 2022 ; Prinz and Priller, 2014 ; Smolders et al., 2019 ; Tay et al., 2017) ; <https://www.proteineatlas.org>

Les degrés d'expression de ces facteurs permettent notamment de différencier les cellules microgliales, résidentes du SNC, des macrophages systémiques. Ainsi, la microglie est considérée comme une population exprimant conjointement CD11b, F4/80 et CD45 à faible niveau (*low*) (CD11b⁺ F4/80⁺ CD45^{lo}), alors que les macrophages systémiques expriment CD45 à plus haut niveau (*high*) (CD11b⁺ F4/80⁺ CD45^{hi}) (Grabert et al., 2016).

ii. *Marqueurs spécifiques à la population microgliale*

En conditions physiologiques, la **protéine transmembranaire 119** (TMEM119) et le **récepteur purinergique P2Y12** (P2RY12) sont spécifiquement exprimés par la microglie chez l'humain et chez la souris, permettant de la différencier des autres cellules de l'immunité (macrophages et monocytes). Ce sont donc des marqueurs particulièrement intéressants dans l'étude de ces cellules et dans celle de l'invasion (ou non) du cerveau par les macrophages, notamment dans un contexte pathologique (Gómez Morillas et al., 2021 ; Ruan and Elyaman, 2022).

iii. *Profils spécifiques à la région cérébrale*

Les premiers travaux ayant mis en évidence l'hétérogénéité des transcriptomes des cellules microgliales chez la souris entre le cervelet, le cortex, l'HPC et le striatum datent de 2016 (Grabert et al., 2016). Les auteurs ont remarqué une hétérogénéité dans l'expression de gènes impliqués dans l'immuno-vigilance ou le métabolisme énergétique selon les structures cérébrales étudiées. L'expression de gènes impliqués dans la vigilance immunitaire semble corrélée à celle de certains gènes du métabolisme énergétique dans l'HPC et le cervelet. Plus récemment, Barko et al. ont révélé l'ampleur des différences d'expression transcriptomique entre les cellules microgliales du PFC, du striatum et du mésencéphale (VTA + substance noire (SN)) chez la souris (Barko et al., 2022). Ils ont observé que le mésencéphale présente un profil transcriptomique différent du PFC et du striatum. Ils ont notamment remarqué que certains transcrits sur-exprimés dans le mésencéphale par rapport aux deux autres structures sont impliqués dans la fonction immunitaire (protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (« *major histocompatibility complex* », MHC) par exemple). A l'inverse, une partie des transcrits sous-exprimés dans le mésencéphale par rapport au PFC et au striatum sont impliqués dans la fonction et l'organisation pré- et post- synaptique (Barko et al., 2022). Une différence notable de patterns d'expression entre mâles et femelles est aussi rapportée dans cette étude (Barko et al., 2022).

Ainsi, l'identification de différents sous-types (parfois appelés « clusters ») de cellules microgliales peut se fonder sur l'ensemble des niveaux d'expressions de leurs différents marqueurs. Un récent consensus établit que les cellules microgliales sont, de manière générale, identifiables par l'expression de PU.1, Iba1, P2YR12, TMEM119 et CSF1R (Paolicelli et al., 2022). Une attention doit être portée au fait que, non seulement les expressions de ces marqueurs peuvent dépendre des cellules et des régions cérébrales, mais également des contextes, puisque certains d'entre eux voient leur expression réduite dans des conditions pathologiques (Paolicelli et al., 2022).

2) Morphologie et états d'activation : classifications des cellules microgliales

Dès 1919 et sa première description de la microglie, Pío del Río-Hortega décrit les microglies comme des cellules ayant un petit soma ainsi que de longs et fins prolongements

cellulaires (Sierra et al., 2016). Il remarque que ces petites cellules peuvent présenter plusieurs formes et degrés d'élongation en fonction de leurs localisation et états d'activation (Sierra et al., 2016). Cette grande plasticité morphologique est l'une de leurs principales caractéristiques, et leurs changements morphologiques peuvent être associés à des fonctions spécifiques.

i. Classification morphologique

En 1919, Pío del Río-Hortega remarque que les cellules microgliales peuvent avoir des polarités différentes. Il observe notamment des cellules monopolaires, bipolaires et multipolaires, selon si les prolongements cytoplasmiques de ces cellules prennent, respectivement, une, deux ou plusieurs directions (Sierra et al., 2016). Il décrit également plusieurs types de microglie sur la base de leur élongation (notamment, la forme dite en bâtonnets (« *rod cells* ») qui fut décrite dès 1899 par Franz Nissl), de leur niveau de complexité (hypertrophie ou non) et de la présence d'éléments phagocytés en leur sein (« *granuloadipose bodies* ») (Figure 24).

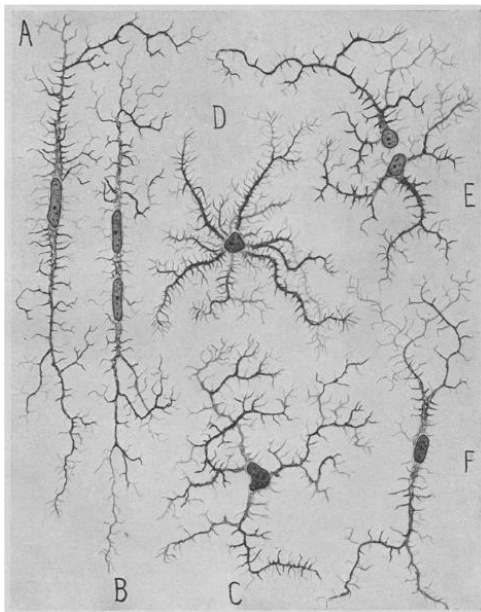


Figure 24. Dessin de Pío del Río-Hortega illustrant les différentes morphologies des cellules microgliales chez l'humain. (A) Cellules bipolaires ; (B) Cellules allongées à deux noyaux ; (C) Cellules multipolaires ramifiées ; (D) Cellules multipolaires ultra-ramifiées ; (E) Couple isogénique (cellules microgliales issues d'une division cellulaire) ; (F) Cellule bipolaire avec prolongements en forme de fourche (Sierra et al., 2016).

En se basant sur dix-huit paramètres incluant l'aire du soma, celle de la cellule entière, la longueur totale des prolongements cellulaires et le nombre de points terminaux, Leyh et al. ont développé un algorithme permettant de traiter des images 2D et d'ainsi classifier les cellules microgliales (du cortex et de l'HPC) en 4 groupes (Leyh et al., 2021) (Figure 25).

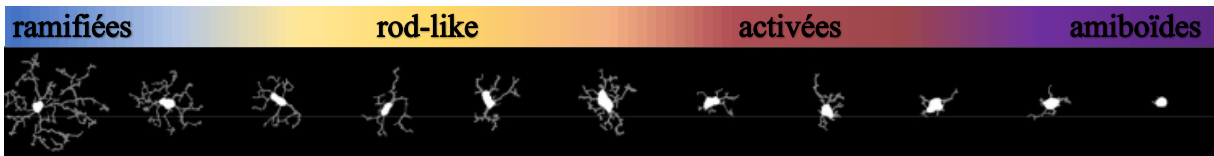


Figure 25. Exemple de cellules microgliales sélectionnées comme base de la classification aux travaux de Leyh et al. (2021)

Les deux extrêmes de cette classification définissent deux groupes de morphologies opposées : ramifiée et amiboïde.

Les cellules ramifiées

Les cellules microgliales ramifiées ont un petit soma, et une grande arborisation de leurs prolongements cellulaires. Longtemps considérées comme étant la forme de repos des cellules microgliales (« *resting* »), les cellules ramifiées sondent leur environnement en allongeant et en rétractant leurs prolongements. Elles se révèlent plus dynamiques que leur description originelle ne l'avait laissé penser, il est donc plus correct de qualifier ces cellules de « surveillantes » (« *surveilling* ») (Leyh et al., 2021 ; Sierra et al., 2016).

Les cellules amiboïdes

Caractérisée par un soma rond, de plus grand volume et une diminution du nombre de prolongements cellulaires, la forme amiboïde est observée dès les premiers stades développementaux et est associée à un état particulièrement dynamique (Leyh et al., 2021 ; Sierra et al., 2016). Les cellules amiboïdes sont capables de réagir rapidement et de migrer vers un site lésé et/ou de phagocyter des débris cellulaires et des agents à éliminer. De ce fait, la forme amiboïde est considérée comme celle associée aux dommages cellulaires et aux maladies (« *disease-associated microglia* », DAMs) (Leyh et al., 2021). Puisqu'elle présente un grand pouvoir phagocytaire, il est possible que cette morphologie corresponde aux cellules décrites par Pío del Río-Hortega comme étant remplies de matériels phagocytés (« *granuloadipose bodies* ») (Sierra et al., 2016).

Les microglies présentent des états intermédiaires entre morphologie ramifiée et morphologie amiboïde :

Les cellules en bâtonnets (« *rod cells* »)

Les cellules en bâtonnets présentent un nombre réduit de prolongements cellulaires, (notamment de branches secondaires) et un soma allongé (Leyh et al., 2021). Elles sont symétriques et sont principalement observées dans le cortex cérébral (Ziebell et al., 2012). Une de leur particularité est que, dans une condition de lésion cérébrale traumatique, elles seraient capables de s'aligner, et de former un train de cellules microgliales parallèlement aux fibres neuronales, le but supposé étant de contenir les dommages tissulaires (Ziebell et al., 2012).

Les cellules « activées »

Les cellules « activées » constituent une forme intermédiaire proche de la forme amiboïde. Elles présentent, comme les cellules amiboïdes, une réduction du nombre de prolongements cellulaires, un soma plus arrondi que celui des *rod cells*, et d'un volume supérieur à celui des cellules ramifiées (inférieur à celui des amiboïdes) (Leyh et al., 2021).

L'organisation spatiale et le rôle précis de chacun des états morphologiques ne sont pas parfaitement compris (Leyh et al., 2021). Dans un modèle de lésion cérébrale traumatique, les formes en bâtonnets et « activées » contribueraient davantage à la réparation des tissus lésés qu'au nettoyage des débris cellulaires (Ziebell et al., 2012) et la fonction de phagocytose serait ainsi prééminente chez les cellules amiboïdes. Les morphologies des cellules microgliales peuvent aussi dépendre du degré de motilité nécessaire à ces cellules. Une forme allongée et moins ramifiée favoriserait le mouvement au sein du tissu. De plus, la perte de ramifications pourrait aussi correspondre à un changement fonctionnel : les cellules microgliales en mouvement, engagées dans un processus de réparation tissulaire ou de phagocytose, n'ont plus besoin de toutes leurs ramifications, qui jusqu'alors jouaient le rôle de *senseurs*. Par une analyse algorithmique d'images 3D, Salamanca et al. ont mis en évidence 10 clusters de cellules Iba1+ présentant des propriétés morphologiques distinctes, au sein de l'HPC humain et celui de la souris. Il est possible que l'ensemble de ces clusters intègrent des formes intermédiaires aux quatre morphologies décrites ci-dessus (Salamanca et al., 2019).

Bien que la morphologie des cellules soit un paramètre relativement facile à étudier et permette d'identifier de potentielles différences de réactivité microgliale, il est à noter qu'une étude d'images ne permet pas d'obtenir un spectre complet d'informations (Salamanca et al., 2019). De plus, le choix des critères de classification reste arbitraire.

ii. *Etats d'activation : M1 versus M2*

Une autre classification existe, résumant schématiquement les deux principales réponses inflammatoires médiées par la microglie : l'une est pro-inflammatoire et l'autre anti-inflammatoire (Tang and Le, 2016). Cette classification se base sur les voies de signalisation qui sont activées au sein des cellules et les molécules qu'elles libèrent (Zhang et al., 2018). Ces états sont : M0, pour l'état dit de « repos », dont la définition se rapproche des caractéristiques attribuées précédemment à la microglie ramifiée ; M1, pour la microglie dont l'activation à un potentiel cytotoxique ; et M2, pour l'activation neuroprotectrice. Il y a quelques années, le phénotype M2 a été révisé, et divisé en trois modes : M2a, M2b, et M2c (Franco and Fernández-Suárez, 2015 ; Tang and Le, 2016 ; Zhang et al., 2018). L'ajout d'un état M3 à cette classification a été envisagé (Walker and Lue, 2015) (Tableau 2).

Etats d'activation		Marqueurs	Induction	Sécrétion	Rôle
M0 « resting » « surveilling »		CX3CR1, CD11b, CD45 ^{lo}	Surveillance, gardiens de l'intégrité cérébrale		
M1 <i>Activation classique</i>			IFN- γ , toxines bactériennes	IL-6, IL-1β IL-12, TNF-α , IL-23, CCL5, CCL11, CD16, CD86 + ROS, iNO, NO	Neurotoxique, libération de cytokines pro-inflammatoires
M2 <i>Facilite la phagocytose, la réparation des tissus et la survie neuronale</i>	M2a <i>Activation alternative</i>		IL-4, IL-13	Arg1, YM1, Fizz1, CD206	Réparation, régénération
	M2b <i>Activation transitoire</i>		TLR, IL-1 β via IL-1R	MHC II, CD80, CD86	Régulation immunitaire
	M2c <i>Dé-activation acquise</i>		IL-10, TGF- β	SOCS3, CD206, CCR2, IL-4R α , CD150, CD163	Neuroprotection, libération de cytokines anti-inflammatoires
M3 ? <i>Division cellulaire</i>			CSF1 _R , IL-4, IL-34		Défense anti-inflammatoire, réparation tissulaire

Tableau 2. Classification des états activations selon la nomenclature M0, M1 et M2 (et M3). Adapté de (Czapski and Strosznajder, 2021 ; Dudvarski Stankovic et al., 2016 ; Franco and Fernández-Suárez, 2015 ; Tang and Le, 2016 ; Walker and Lue, 2015 ; Zhang et al., 2018).
Arg1 : Arginase 1 ; *CD206* : Mannose receptor ; *FIZZ1* : Found in inflammatory zone 1 and *Chi3l3* : Chitinase-3-Like-3.

Les cellules microgliales, en réponse à une lésion ou à une infection, passeraient d'un état d'activation M0 à M1. Elles pourraient alors être suffisamment agressives, notamment lors de la nécessité d'éliminer un agent intrus. Par la suite, elles évolueraient vers un état M2 afin de réparer les tissus lésés (Kigerl et al., 2009 ; Yunna et al., 2020). Via leur sécrétion par la microglie M2, IL-4 et IL-13 stoppent la production de cytokines pro-inflammatoires (notamment IL-8, IL-6 et TNF- α) et diminuent la libération de monoxyde d'azote (NO). Ainsi, la forme M2 promeut la réparation du tissu et la survie neuronale (Tang and Le, 2016). En condition de stress chronique, la microglie tend à présenter une activation de type M1 menant à du stress oxydatif et une inflammation, elle aussi, chronique (Zhang et al., 2018).

La manière de classer (ou non) les cellules microgliales est controversée et la classification M0-M1-M2, trop simpliste, tend à être abandonnée. Les cellules microgliales sont très plastiques, et semblent pouvoir présenter une grande variété de profils, ce qui rend difficile leur ségrégation en des phénotypes d'activation distincts. En effet, l'hypothèse qu'elles peuvent passer par un continuum d'états d'activation (comprenant des spécificités morphologiques, transcriptomiques, protéomiques, métaboliques et épigénétiques) est plus à même d'expliquer leur grande hétérogénéité. Ainsi, un nouveau point de vue se basant sur l'hypothèse d'une coexistence d'états d'activation au sein de la population microgliale émerge ; la cellule dite quiescente, ramifiée, étant elle-même considérée comme active (Paolicelli et al., 2022) (Figure 26).

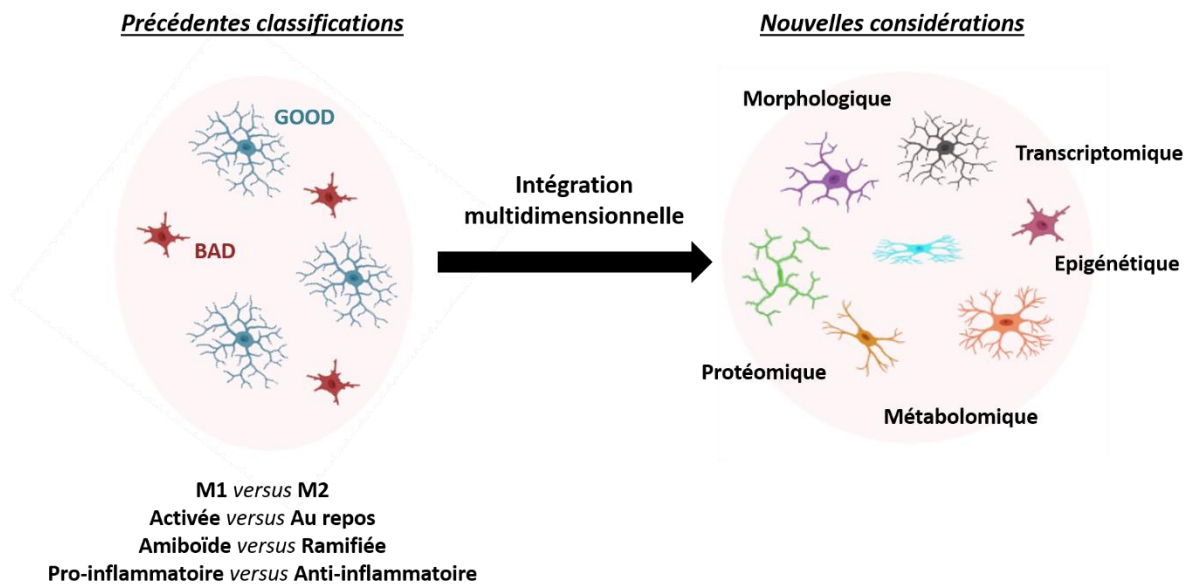


Figure 26. Nomenclature passée et présente. Adaptée de Paolicelli et al. (2022)

Schéma créé à l'aide de [BioRender.com](https://www.biorender.com)

3) Régulateurs de l'activité microgliale

La microglie exprime un grand nombre de récepteurs (Garaschuk and Verkhratsky, 2019) qui leur permettent de sonder les changements environnementaux. Ces récepteurs participent à la communication qui s'établit entre les différents types cellulaires, et permettent ainsi le maintien de l'intégrité tissulaire. L'ensemble des informations perçues par les cellules microgliales au moyen de leurs récepteurs leur permettent de s'adapter aux besoins de l'environnement dans lequel elles évoluent. Ici, nous évoquerons quelques neurotransmetteurs, cytokines et autres molécules impliquées dans la régulation du phénotype microglial (la liste demeurant non-exhaustive).

i. Neurotransmetteurs

Les cellules microgliales expriment des récepteurs aux neurotransmetteurs. Ces derniers, libérés dans le milieu extracellulaire durant l'activité neuronale, peuvent moduler la microglie et ses modes d'actions.

Dopamine

Puisque la microglie est présente dans toutes les structures cérébrales (y compris le NAcc, le PFC et la VTA), elle est exposée à la dopamine. Plusieurs études et revues ont révélé

que la dopamine module l'activité de la microglie, via son expression des récepteurs de type D₁ (D₁R) et de type D₂ (D₂R) (Färber et al., 2005 ; Sarkar et al., 2010 ; Shao et al., 2013 ; Vidal and Pacheco, 2020 ; Yan et al., 2015). Notamment, la dopamine empêche la transcription de cytokines pro-inflammatoires (signalisation médiée par les D₂R), et diminue la libération d'interleukines par la microglie (signalisation D₁R) (Shao et al., 2013 ; Yan et al., 2015). Par ailleurs, l'activation des récepteurs DA atténue la libération de monoxyde d'azote (NO) (Färber et al., 2005). Le *knock out* du D₂R (souris *Drd2*^{-/-}) cause une augmentation de l'expression de gènes pro-inflammatoires (notamment IL-1 β et IL-6) et de CD68 (Shao et al., 2013). Ainsi, une hypoactivité dopaminergique pourrait participer à l'induction d'un contexte inflammatoire (Sarkar et al., 2010). A l'inverse, l'activation de la signalisation D₂R pourrait être neuroprotectrice dans certains contextes pathologiques, comme cela a été montré dans un modèle de souris de la maladie de Parkinson (administration de MPTP, une neurotoxine qui, en détruisant certains neurones de la SN, provoque des symptômes permanents rappelant ceux de la maladie de Parkinson) (Shao et al., 2013). *In vitro*, il a été observé que la dopamine pourrait exercer un contrôle négatif sur l'activité phagocytaire des cellules microgliales (Fan et al., 2018). Certaines études suggèrent que l'expression des D₂R par la microglie serait induite selon l'état d'activation du tissu et des cellules *in vivo*, alors qu'elle serait constitutive dans des cultures primaires microgliales (Dominguez-Meijide et al., 2017). La dopamine est ainsi un agent important dans la régulation de la microglie en conditions physiologiques et pathologiques. Elle interviendrait dans le contrôle de l'inflammation, notamment dans le cadre de maladies à composante inflammatoire où une hyperactivité microgliale contribue à la neurotoxicité et à la neurodégénérescence (comme dans la maladie de Parkinson).

Glutamate

En 2000, Noda et *al.* ont mis en évidence que, dans des cultures primaires microgliales de rat, les cellules expriment les récepteurs ionotropiques AMPA (AMPA_R) et kaïnate, et l'ajout de glutamate à la culture promeut la production de TNF- α (Noda et al., 2000). Mais la microglie exprime également des récepteurs NMDA (NMDA_R) (Liu et al., 2016) et des récepteurs métabotropiques au glutamate (Biber et al., 1999 ; Budgett et al., 2022 ; Liu et al., 2016). Chez le rat nouveau-né soumis à une hypoxie, les NMDA_R sont exprimés par les cellules microgliales amiboïdes et leur activation permet la transcription de NF- κ B en induisant sa translocation nucléaire, déclenchant ainsi l'expression de TNF- α , IL-1 β et des espèces réactives de l'oxygène (ROS ; ici iNOS, « *inducible nitric oxide synthase* ») menant *in fine* à la production de

monoxyde d'azote (NO) (Murugan et al., 2011). Par de l'imagerie dynamique sur des explants rétiniens de souris CX3CR1^{+/GFP}, Fontainhas et al. ont observé qu'en présence d'un antagoniste des AMPA_R et des récepteurs kaïnate, le NBQX (*1,2,3,4-tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide disodium*), les cellules microgliales connaissent de rapides (entre 1 et 3 minutes) changements morphologiques : elles perdent en taille et en densité de leurs ramifications, sans pour autant devenir amiboïde (Fontainhas et al., 2011). Après rinçage du milieu, la microglie retrouve sa forme ramifiée en l'espace de 8 minutes. A l'inverse, en présence d'AMPA, la microglie répond en augmentant la surface couverte par ses prolongements et leurs niveaux de complexité. Des effets similaires sont observés en présence de kaïnate. En parallèle, le blocage des NMDA_R par leur antagoniste sélectif APV (*2-amino-5-phosphonopentanoic acid*) et l'application de NMDA sur les explants n'a que des effets faibles sur la morphologie microgliale, témoignant ainsi d'une contribution comparativement moins importante de ces récepteurs dans le maintien de l'arborisation des prolongements microgliaux (Fontainhas et al., 2011). Enfin, les AMPA_R – et dans une moindre mesure les NMDA_R – sont impliqués dans la motilité des prolongements microgliaux (Fontainhas et al., 2011).

GABA

L'application de bicuculline (antagoniste des GABA_A) sur une fenêtre crânienne permettant l'observation de cellules microgliales *in vivo* a montré que ces dernières répondent en augmentant leur volume (Nimmerjahn et al., 2005). Une même application sur des explants rétiniens de souris CX3CR1^{+/GFP} a des effets mineurs mais contraires à ceux induit par les bloqueurs des AMPA_R et des NMDA_R : une légère augmentation des paramètres morphologiques étudiés a été mesurée. A l'inverse, l'ajout de GABA au milieu induit une diminution de la longueur totale des prolongements cellulaires et réduit la complexité de l'arborisation des ramifications, mais sans réduction de l'aire occupée (Fontainhas et al., 2011). Enfin, alors que l'ajout de AMPA au milieu promeut le dynamisme des prolongements microgliaux, l'application de GABA le diminue (Fontainhas et al., 2011). L'application de muscimol (agoniste des GABA_A) et de baclofène (agoniste des GABA_B) promeut l'activité neuroprotectrice de la microglie (Tremblay and Sierra, 2014).

ATP

En utilisant un modèle d'explants rétiniens de souris CX3CR1^{+/GFP}, Fontainhas et al. ont observé que l'ajout d'ATP attire les prolongements microgliaux et parfois induit le mouvement

de la cellule entière (chimiotaxie) (Fontainhas et al., 2011). Les auteurs ont également observé qu'en réponse à l'ATP, la microglie augmente rapidement sa taille et la complexité de ses ramifications. Ces effets sont médiés par les récepteurs purinergiques P2X- (notamment les récepteurs P2X7 et P2X4) et P2Y- (notamment le récepteur P2Y12). Dans des cultures primaires de cellules microgliales, l'application d'ATP seul induit une libération de NO (Boucsein et al., 2003). Cependant, la production de cytokines et la libération de NO consécutive à l'application de lipopolysaccharide (LPS, un glycolipide de la membrane externe des bactéries Gram-négatives) sur ces cultures, sont toutes deux atténuées par l'activation des récepteurs purinergiques (Boucsein et al., 2003). Ainsi, les récepteurs purinergiques peuvent influencer sur l'activation microgliale, et leurs effets semblent dépendre de la concentration d'ATP.

ii. Récepteurs aux cytokines

La microglie exprime également des récepteurs aux cytokines, en particulier à la chimiokine ligand C-X3-C 1 (CX3CL1) et à l'interleukine 6 (IL-6).

CX3CR1, le récepteur de CX3CL1 (fractalkine)

CX3CL1, aussi connue sous le nom de fractalkine, est une chimiokine dont le récepteur est CX3CR1 et qui est presque exclusivement libérée par les neurones (Tarozzo et al., 2003). L'activation de CX3CR1 atténue la production de cytokines pro-inflammatoires et de iNOS induite par l'activation microgliale (Mizuno et al., 2003). Dans un modèle d'inflammation neuronale obtenue par injection de LPS au sein des ventricules cérébraux, un traitement *in vivo* d'anti-CX3CL1 augmente la production cérébrale de TNF- α , suggérant que la perturbation de la signalisation CX3CL1 – CX3CR1 promeut la réponse microgliale au LPS (Zujovic et al., 2001). L'injection intrapéritonéale de LPS chez des souris knock-out pour CX3CR1 (CX3CR1^{-/-}) cause une large activation microgliale (Cardona et al., 2006). Par son activation, CX3CR1 promeut la survie neuronale dans un modèle de cultures cellulaires mixtes (neurones + microglie) mises en présence de LPS. Ainsi, l'activité fractalkine semble contrer les effets neurotoxiques de l'activation microgliale (Mizuno et al., 2003). Enfin, les souris CX3CR1^{-/-} présentent une densité en cellules microgliales altérée entre la deuxième et la quatrième semaine post-natale, suggérant que la signalisation CX3CL1 – CX3CR1 est également

nécessaire à la bonne distribution des cellules microgliales au sein du cerveau en développement, et donc régule indirectement leur fonction (Paolicelli et al., 2011).

IL-6R (CD126), le récepteur de l'IL-6

En condition physiologique, l'interleukine 6 (IL-6) est présente à faible niveau dans le cerveau mais sa concentration augmente fortement dans certaines pathologies neurologiques (par exemple la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson). L'IL-6 médie un grand nombre de fonctions : elle exerce à la fois un rôle neuroprotecteur et un rôle causal dans la neurodégénérescence associée à certaines pathologies. Ces deux effets s'expliquent par son implication dans deux voies de signalisation : respectivement, la voie classique et la voie dite de *trans-signaling* (Rothaug et al., 2016). La microglie sécrète l'IL-6 et exprime son récepteur IL-6R (aussi appelé CD126 pour « *cluster of differentiation 126* ») ainsi que la glycoprotéine gp130 dont la dimérisation est nécessaire au fonctionnement d'IL-6R (voie classique) (Rothaug et al., 2016). Dans un modèle de souris d'inflammation chronique induite par surexpression constitutive d'IL-6 par les astrocytes (souris GFAP-IL6), la complexité des ramifications de la microglie est réduite et sa distribution cellulaire est modifiée par un turn-over altéré (augmentation de la prolifération et possible réduction de l'apoptose) (Recasens et al., 2021; West et al., 2022). Cette exposition chronique à l'IL-6 induit des profils d'expression uniques chez les cellules microgliales exposées : ces cellules présentent notamment une diminution de l'expression de surface de TMEM119 et *a contrario*, une augmentation de celle de CD11b (West et al., 2022).

iii. Autres récepteurs

Enfin, la microglie exprime des récepteurs du système du complément et des récepteurs *Toll-like*, tous participant à la modulation de son activité.

Le système du complément

Le système du complément est un acteur majeur de l'immunité innée. Il comprend une trentaine de protéines (notamment C1q et C3) appartenant au MHC, et intervient dans l'élimination des pathogènes. Dans le cerveau sain, la synthèse locale des protéines du complément est permise par les différents types cellulaires (Druart and Le Magueresse, 2019). La microglie présente plusieurs récepteurs impliqués dans la signalisation du complément. Elle

exprime le récepteur de C1q (C1qR), ainsi que les récepteurs des produits de clivage de C3 : le récepteur de l'anapylatoxine C3a (C3aR) et le récepteur du fragment protéique iC3b, le récepteur du complément 3 (CR3) (qui est constitué de deux intégrines CD11b et CD18) (Druart and Le Magueresse, 2019). Les signalisations iC3b – CR3 et C3a – C3aR sont impliquées dans la réactivité microgliale ainsi que dans l'élagage synaptique médié par la microglie au cours du développement (Litvinchuk et al., 2018 ; Schafer et al., 2012).

Les récepteurs *Toll-like* et les DAMPs / PAMPs

Les récepteurs *Toll-like* (TLR) sont une famille d'une dizaine de récepteurs impliqués dans la reconnaissance de patterns moléculaires associés à des pathogènes (PAMPs pour « *pathogen-associated molecular patterns* ») ou à des dommages (DAMPs pour « *damage/danger-associated molecular patterns* ») (Kumar, 2019 ; Lehnardt, 2010). Ces récepteurs peuvent ainsi reconnaître comme ligands des patterns moléculaires issus de bactéries, de virus, ou de champignons (« *fungi* ») (Walker, 2020). Les TLR3 reconnaissent les ARN double-brin viraux (dsRNA pour « *double-stranded RNA* ») et les TLR4, les lipopolysaccharides issus des membranes bactériennes Gram-négatives. Les TLR3 reconnaissent également l'acide polyinosinique-polycytidylique (Poly(I:C)), un ARN double-brin synthétique, utilisé lors d'expérimentations dans le but de mimer une infection virale. De la même manière, les TLR4 ont pour ligand le LPS, un lipopolysaccharide bactérien, permettant de mimer une infection bactérienne (Akira et al., 2006 ; Jack et al., 2005 ; Lehnardt, 2010). Enfin, les TLR11 reconnaissent comme ligand le parasite *Toxoplasma gondii* (Lehnardt, 2010). En présence d'un ligand, les TLR peuvent induire la transcription de NFκB, qui a son tour régule l'expression d'un grand nombre de gènes. Généralement, la signalisation TLR conduit à une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires nécessaires à l'élimination du pathogène (Jack et al., 2005 ; Lehnardt, 2010). Ainsi, l'activation des TLR, bien que permettant l'induction de l'apoptose du pathogène et donc contenant la propagation de l'inflammation, peut aussi avoir un effet délétère sur la survie neuronale en contribuant indirectement à la neuro-inflammation et à la neurodégénérescence (Lehnardt, 2010).

Pour finir, l'une des protéines spécifiques aux cellules microgliales est la protéine transmembranaire 119 (TMEM119). Sa récente identification fait que son rôle dans l'activation microgliale reste relativement mal connu. Cependant, certaines hypothèses ont été formulées.

TMEM119

Identifiée en 2016, TMEM119 est depuis considérée comme l'un des marqueurs les plus fiables pour identifier les cellules microgliales chez l'humain et chez la souris (Bennett et al., 2016). Cette protéine est exprimée par la microglie ramifiée, en condition « homéostatique », et son expression est drastiquement réduite en conditions pathologiques (Sato et al., 2019 ; van Wageningen et al., 2019). Kenkhuis et *al.* notent cependant que la diminution d'expression de TMEM119, remarquée en conditions pathologiques, n'est pas présente dans toutes les cellules microgliales (Kengkuis et al., 2022). A ce jour, la fonction précise et les ligands endogènes de TMEM119 demeurent mal connus. En conditions pro-inflammatoires, l'expression de TMEM119 n'est pas seulement diminuée mais également limitée aux phagosomes (Ruan and Elyaman, 2022). Ces derniers sont *in fine* dégradés, ce qui pourrait expliquer la baisse d'expression constatée. Ruan & Elyaman font, de ce fait, l'hypothèse que TMEM119 est impliquée dans la fonction phagocytaire de la microglie, et notamment dans l'élimination des débris cellulaires et des agrégats protéiques toxiques (Ruan and Elyaman, 2022).

Autrefois considérée comme une population relativement homogène, quiescente ou activée, pro-inflammation ou anti-inflammation, la microglie présente, en réalité, une très grande hétérogénéité d'états, au sein même d'une structure et plus largement entre les structures cérébrales voire entre les individus. La fonction microgliale dépend ainsi de facteurs incluant génétique et environnement, âge de l'individu, de la région cérébrale considérée, et également des changements d'activité au sein des réseaux neuronaux.

Pour finir, cette hétérogénéité des cellules microgliales est amplifiée en conditions pathologiques. La microglie associée aux pathologies (DAMs pour « *disease-associated microglia* ») présente un grand nombre d'états dépendamment du contexte (ici, pathologique) et de l'espèce : par exemple, dans la maladie d'Alzheimer, ont été définis les MGnD (pour « *microglial neurodegenerative phenotype* ») (Krasemann et al., 2017), les ARMs (pour « *activated response microglia* ») et les IRMs (pour « *interferon-responsive microglia* ») (Sala Frigerio et al., 2019) ou encore les HAMs (pour « *human Alzheimer disease microglia* ») (Paolicelli et al., 2022 ; Srinivasan et al., 2020). Ces différentes populations de DAMs ont été identifiées dans un contexte pathologique particulier, et il est peu probable qu'elles constituent des populations distinctes les unes des autres *stricto sensu*. De plus, à l'instar des cellules

microgliales en conditions homéostatiques, ces DAMs sont probablement à même de voir leurs propriétés évoluer dans le temps, et ne constituent donc pas une population microgliale qui serait dans un état défini et définitif (Paolicelli et al., 2022).

4. La microglie, actrice du développement

La grande hétérogénéité des cellules microgliales reflète la multiplicité des fonctions qu'elles assurent au sein du SNC. En effet, la microglie est impliquée dans un grand nombre de processus au cours de la vie pré- et post-natale. Elle participe à la mise en place de la vascularisation au sein du cerveau et au maintien de l'intégrité de la BHE. Elle joue un rôle dans la neurogenèse, et plusieurs études ont démontré son importance dans la formation, la modulation et le raffinement des synapses.

1) Angiogenèse et maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique

Les interactions entre la vascularisation et la microglie ne s'arrêtent pas à la phase développementale de migration des cellules microgliales vers / dans le SNC. Dans la rétine par exemple, la microglie est présente avant la formation des vaisseaux sanguins. A 15 spf chez l'humain, alors que la microglie occupe déjà toute la surface rétinienne, la vascularisation commence seulement (Checchin et al., 2006). De plus, dans la rétine, la déplétion de la microglie diminue l'aire recouverte par la vascularisation et la densité en vaisseaux sanguins ; des altérations qui sont restaurées par l'injection locale de nouvelles cellules microgliales (Checchin et al., 2006). Plusieurs études ont révélé que l'action des cellules microgliales serait permise par leur proximité physique avec les vaisseaux sanguins (Bisht et al., 2021 ; Checchin et al., 2006 ; Mondo et al., 2020). Cette interaction est médiée par les récepteurs microgliaux P2RY12 et les purines libérées par les canaux PANX1 (pannexine 1) des cellules endothéliales (Bisht et al., 2021 ; Mondo et al., 2020). La suppression de cette signalisation, par l'ablation génétique de P2RY12 ou l'utilisation d'un inhibiteur (clopidogrel), altère les mouvements juxta-vasculaires des prolongements microgliaux (Nanhong et al., 2016). La barrière hémato-encéphalique (BHE) est formée d'un syncytium de cellules endothéliales, assemblé à des péricytes et des astrocytes. L'intégrité de de cette barrière est cruciale pour le bon développement et la mise en place des fonctions du SNC. Dans un modèle de lésion par laser de la BHE, le blocage de l'activation des P2RY12 microgliaux empêche le colmatage de la

brèche, démontrant non seulement le rôle de cette signalisation dans le maintien de la BHE, mais surtout l'implication de la microglie et la nécessité de sa motilité (Nanhong et al., 2016). Dans un modèle murin d'inflammation systémique présentant une augmentation de la perméabilité de la BHE, la densité de cellules microgliales se trouvant aux abords des vaisseaux sanguins, dans le cortex, est augmentée et une réduction de leur densité est observée dans le parenchyme cérébral, suggérant une migration en réponse à l'inflammation (Haruwaka et al., 2019). Les auteurs ont également remarqué des changements morphologiques microgliaux (phénotype phagocytaire) (Haruwaka et al., 2019). De façon intéressante, l'inhibition de l'activation microgliale par un traitement à la minocycline (Kobayashi et al., 2013), une tétracycline de seconde génération ayant des propriétés anti-inflammatoires, semble réduire la perméabilité de la BHE dans des modèles rongeurs de la maladie d'Alzheimer et d'accident vasculaire cérébral, suggérant que la microglie peut jouer un rôle, à la fois, protecteur et délétère dans la réponse à l'inflammation (Dudvarski Stankovic et al., 2016; Hattori, 2022; Ronaldson and Davis, 2020; Ryu and McLarnon, 2006; Yang et al., 2015).

2) De la neurogenèse à l'établissement de la distribution cellulaire

i. Neurogenèse

Comme indiqué précédemment, l'entrée de la microglie dans le futur SNC intervient à un stade proche de la neurulation et du pic de **neurogenèse développementale**. A leur entrée dans le SNC, les cellules microgliales restent denses au sein de la VZ, lieu d'émergence des progéniteurs neuronaux. Dans la VZ du cortex cérébral fœtal, chez le macaque, Cunningham et al. ont observé que la microglie est capable d'engloutir des précurseurs neuronaux mitotiques (Cunningham et al., 2013). Afin d'étudier l'action microgliale sur le pool de précurseurs neuronaux, les auteurs ont utilisé un modèle d'activation immunitaire maternelle chez le rat et ont observé que le nombre de précurseurs neuronaux au sein de la VZ à E19 est significativement réduit. A l'inverse, un traitement à la doxycycline, une tétracycline qui inhibe l'activation microgliale (Santa-Cecília et al., 2016), augmente significativement leur nombre. Ces résultats sont confirmés *in vitro*, par l'utilisation de liposomes de clodronate (ablation de la microglie) et de minocycline sur des tranches organotypiques (Cunningham et al., 2013). De façon intéressante, des cultures de précurseurs corticaux issus d'embryons de souris PU.1^{-/-} présentent moins de précurseurs neuronaux mitotiques que des cultures contrôles issues

d'embryons de souris PU.1^{+/+}, suggérant que la microglie demeure nécessaire à la prolifération des précurseurs neuronaux (Antony et al., 2011). Enfin, la densité de microglie présente dans des cultures organotypiques influe sur le devenir de la glie radiaire, et peut, dans le cas d'une forte présence microgliale, promouvoir le destin astrocytaire de ces cellules au détriment d'un destin neuronal (Antony et al., 2011).

Le rôle de la microglie dans la survie neuronale a également été étudié dans les niches de **neurogenèse adulte**, dont les deux principales sont la SVZ et la zone sous-granulaire (« *subgranular zone* », SGZ) qui est la région proliférative du gyrus denté dans l'HPC (Carpentier and Palmer, 2009 ; Cserép et al., 2022 ; Gonzalez-Perez et al., 2012 ; Sierra et al., 2010).

ii. *Migration et distribution cellulaire au sein du SNC*

Chez la souris durant le développement, les prolongements microgliaux contactent très souvent des précurseurs neuronaux viables (Cserép et al., 2022). Ces contacts sont observés dès E15, avant même l'établissement de synapses et sont permis par des jonctions somatiques dépendantes de la signalisation de P2RY12. Chez la souris nouveau-née, le *knock out* de P2RY12 (P2RY12^{-/-}) altère la distribution des précurseurs neuronaux au sein des couches corticales. Chez l'adulte, ces altérations sont maintenues puisque les animaux P2RY12^{-/-} présentent des défauts de distribution de leurs neurones corticaux (Cserép et al., 2022). Par ailleurs, dans deux modèles de déplétion microgliale chez la souris (blocage de la signalisation du CSF1_R et modèle génétique PU.1^{-/-}), alors que la mise en place des couches corticales semble se faire normalement à E18.5, Squarzoni et *al.* ont constaté une distribution anormale d'interneurones inhibiteurs corticaux déchargeant à haute fréquence (« *fast-spiking interneurons* »), essentiellement des interneurones à parvalbumine (PV) (Squarzoni et al., 2014). Ces altérations, qui touchent de manière prépondérante les couches 3 et 4, sont également observées dans un modèle d'activation immunitaire maternelle. Elles sont susceptibles d'influencer significativement la dynamique des réseaux corticaux, puisque les interneurones corticaux sont particulièrement importants dans le maintien de la balance excitation/inhibition au sein des différentes structures cérébrales et notamment du cortex (Marín, 2012). Ces défauts de distributions cellulaires pourraient s'expliquer par le fait que la

microglie libère des facteurs permettant la bonne migration des précurseurs neuronaux (Aarum et al., 2003).

Ainsi, la microglie contacte directement le soma de précurseurs neuronaux afin d'influencer leur intégration au sein du réseau neuronal (Cserép et al., 2022). Elle est nécessaire à l'établissement de la distribution corticale en neurones, et notamment à la bonne disposition des interneurones corticaux inhibiteurs.

iii. Mise en place des projections axonales

Les cellules microgliales libèrent des facteurs pouvant être impliqués dans la croissance des neurites (Chamak et al., 1994). A E14.5 chez la souris, les neurones DA commencent leur innervation des ganglions de la base et du néocortex. En utilisant deux modèles murins de déplétion microgliale chez l'embryon (stade E14.5), Squarzoni et *al.* ont observé une extension des projections axonales des neurones DA du mésencéphale (Squarzoni et al., 2014). A l'inverse, l'induction d'une activation immunitaire maternelle, par injection intrapéritonéale de LPS à la femelle gestante à E13.5, cause une diminution, petite mais significative, de l'extension axonale des neurones DA du mésencéphale. Les altérations développementales observées ont pour conséquence une innervation anormale du striatum par les neurones DA après la naissance. Une étude des profils transcriptomiques de cellules microgliales, à E17.5, a révélé qu'une altération de leur fonction induit une diminution de l'expression de gènes régulant le développement des neurites (Pont-Lezica et al., 2014).

En conclusion, au cours du développement cérébral les cellules microgliales contrôlent le nombre de précurseurs neuronaux au sein des zones prolifératives du SNC en développement et ainsi, régulent la production de neurones (Antony et al., 2011 ; Cunningham et al., 2013). La microglie est également capable d'influencer le destin cellulaire et l'intégration de ces précurseurs neuronaux au sein du réseau cérébral (Antony et al., 2011 ; Cserép et al., 2022). Enfin, la microglie et son activation contrôlent la mise en place des projections axonales, notamment celles des neurones DA du mésencéphale ciblant le striatum.

3) Interactions microglie – synapses

De nombreuses études ont établi que les cellules microgliales établissent des contacts avec les neurones en ciblant notamment les épines dendritiques, les terminaux axonaux et les fentes synaptiques (Miyamoto et al., 2016 ; Nimmerjahn et al., 2005 ; Tremblay et al., 2010 ; Wake et al., 2009). Ces interactions sont nécessaires au développement normal du SNC.

i. Synaptogenèse

Des travaux *in vitro* sur des cultures primaires de rat ont révélé que la microglie, par la sécrétion d'IL-10, est capable d'induire la formation de synapses excitatrices et inhibitrices (Chen et al., 2016 ; Lim et al., 2013). Chez la souris, entre 8 et 10 jours après la naissance, par de l'imagerie en temps réel (« *time-lapse* ») *in vivo*, Miyamoto et al. ont observé des contacts microglie – neurones au sein du cortex somatosensoriel (Miyamoto et al., 2016). Ces travaux indiquent qu'au cours du développement, les cellules microgliales contactent les dendrites, et ces contacts peuvent déclencher au sein du neurone une réponse calcique. Cette réponse calcique permet une accumulation d'actine et l'apparition d'une longue et fine protubérance dendritique (filopode). Les auteurs notent que certains contacts ne donnent pas lieu à la formation d'un filopode ni même à l'induction d'une réponse calcique neuronale, mais que la probabilité d'émergence d'un filopode est significativement plus importante dans les zones de contacts. De façon intéressante, leurs résultats indiquent que cette probabilité d'apparition d'un filopode dendritique ne diffère plus entre zones contactées et non contactées après 12 jours de vie post-natale. Dans l'heure qui suit leur apparition, 75% de ces filopodes dendritiques nouvellement formés disparaissent. Cependant, il est à noter que la durée de vie des filopodes formés suite à un contact microglie – neurone ayant mené à une réponse calcique neuronale est supérieure à celle des filopodes formés en l'absence de réponse calcique (Miyamoto et al., 2016). Puisque les filopodes peuvent se stabiliser et mûrir pour devenir des épines dendritiques fonctionnelles, la microglie joue un rôle développemental dans l'établissement de futures synapses lors des premiers jours de vie postnatale. En cohérence avec ces observations, par de l'imagerie « *time-lapse* » sur des cultures organotypiques d'hippocampe de souris, Weinhard et al. ont noté que les contacts des dendrites par la microglie peut induire la formation de filopodes qui deviendront des épines dendritiques (Weinhard et al., 2018) (Figure 27). La déplétion de la microglie quelques jours après la naissance diminue significativement le

pourcentage d'épines dendritiques formées sur les neurones principaux de la couche 5 du cortex moteur lors d'une période d'observation de 4 jours, chez des souris âgées de 19 et 30 jours (Parkhurst et al., 2013). Ces souris dépourvues de cellules microgliales présentent des défauts de mémoire et d'apprentissage, expliqués par une réduction de la synaptogenèse dépendante de l'apprentissage (Parkhurst et al., 2013). De tels résultats suggèrent que la microglie est non seulement impliquée dans la formation des synapses chez le nouveau-né (Miyamoto et al., 2016), mais également plus tard au cours du développement post-natal et chez le jeune adulte (Parkhurst et al., 2013).

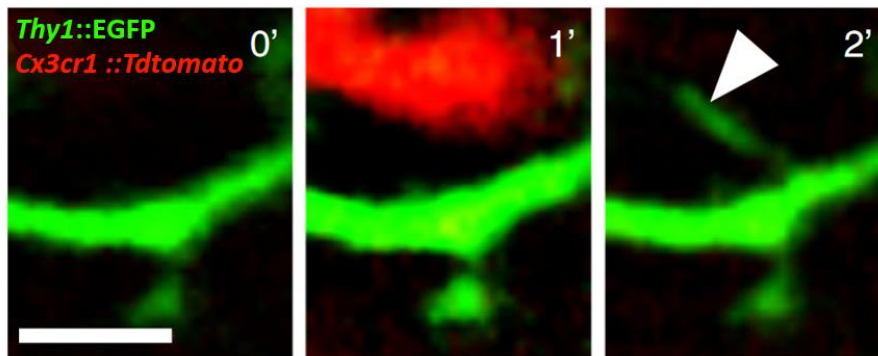


Figure 27. La microglie (rouge) induit la formation d'un filopode par contact avec la dendrite d'un neurone (vert). L'apparition du filopode après le contact se fait en ~ 1 minute. Echelle : 2µm. Adaptée de Weinhard et al. (2018)

Toutes les synapses ne se forment pas sur des épines dendritiques. Contrairement au rôle de la microglie dans la formation des contacts glutamatergiques, l'étude de son implication dans la formation de synapses inhibitrices est bien moins caractérisée.

Ainsi, la microglie participe à la synaptogenèse : elle peut le faire directement via des contacts avec les dendrites promouvant l'apparition d'un filopode dendritique (Miyamoto et al., 2016 ; Weinhard et al., 2018), et il semble aussi possible qu'elle le permette indirectement par sa libération de cytokines (notamment IL-10) (Chen et al., 2016 ; Lim et al., 2013).

ii. *Activité neuronale et modulation synaptique*

Plusieurs études suggèrent que l'activité neuronale module la microglie et ses fonctions. Par exemple, chez la souris adulte, l'application de bicuculline sur la surface d'une fenêtre crânienne permettant l'observation de cellules microgliales GFP+, a montré que ces dernières

répondent rapidement en augmentant le volume cérébral qu'elles sondent (Nimmerjahn et al., 2005). Chez le poisson-zèbre (« *zebrafish* »), l'activité neuronale attire les prolongements microgliaux vers les neurones et promeut les contacts microglie – neurones (Li et al., 2012). Wake et al. ont effectué des injections de tétrotoxine (TTX), un bloqueur des canaux sodiques, dans la rétine chez la souris (Wake et al., 2009). Ils ont alors observé que, dans les quelques heures qui suivent, la réduction des signaux rétiniens diminue significativement la fréquence de contacts entre microglie et synapses au sein du cortex visuel. En utilisant un modèle d'énucléation binoculaire, les mêmes auteurs ont observé une rétraction rapide des prolongements des cellules microgliales au sein du cortex visuel (Wake et al., 2009). Enfin, l'étude des cellules microgliales du cortex visuel de souris plongées dans le noir pendant six jours a révélé une diminution de leur motilité, sans changement de la fréquence de contacts formés avec les épines dendritiques (Tremblay et al., 2010). Il est possible que des réponses microgliales diffèrent en fonction du protocole utilisé, et notamment de la durée de la diminution d'activité neuronale (court *versus* long terme ; quelques heures *versus* plusieurs jours).

Si l'activité neuronale module la microglie, cette dernière influence à son tour la fonction synaptique. Wake et al. font l'hypothèse que les cellules microgliales, par l'intermédiaire de leurs contacts avec les neurones, sondent les changements d'états fonctionnels des synapses (Wake et al., 2009). Lorsque les cellules microgliales contactent des synapses, dans plus de 90% des cas, cette interaction mène en effet à un changement structural des composants synaptiques tel qu'une croissance axonale ou dendritique, et parfois un rétrécissement de l'épine dendritique (Tremblay et al., 2010). Weinhard et al. ont observé que le contact d'une épine dendritique par la microglie peut induire un allongement / étirement de celle-ci voire la formation d'un filopode en son sommet (« *spine head filopodia* », SHP) (Weinhard et al., 2018). Dans 27% des cas une relocalisation de la tête de l'épine dendritique à la pointe du filopode est consécutive à l'apparition d'un SHP. Puisque les épines ayant été ainsi remodelées semblent perdurer plus longtemps, les auteurs font l'hypothèse que ce processus intervient dans la stabilisation des synapses formées (Weinhard et al., 2018).

Ainsi, au cours du développement, la microglie peut moduler la fonction synaptique notamment en induisant des changements structurels des sites pré- et post-synaptique, favorisant la maturation des circuits neuronaux.

iii. *Raffinement synaptique*

La microglie, par ses contacts avec les composants synaptiques (axone, épine, fente synaptique), sonde leur fonction synaptique, et peut induire leur suppression (Tremblay et al., 2010 ; Wake et al., 2009). Deux processus impliquant la microglie interviennent dans la suppression des synapses : le stripping synaptique et l'élagage synaptique.

Le stripping synaptique

Comme nous l'avons indiqué plus haut, les cellules microgliales sont capables de défaire certains contacts synaptiques formés entre les motoneurons d'un nerf lésé et leurs afférences. Ce processus a été qualifié de stripping synaptique (« *synaptic stripping* ») (Blinzinger and Kreutzberg, 1968 ; Kreutzberg, 1996) et se caractérise par l'infiltration d'un prolongement des cellules microgliales entre les sites pré- et post-synaptiques. Ce mode d'action serait particulièrement effectif dans des conditions pathologiques, lorsqu'un site pré- ou post-synaptique viable doit être retiré de sa cible pré- ou post-synaptique lésée, en cours de dégénérescence ou de régénération (Blinzinger and Kreutzberg, 1968 ; Di Liberto et al., 2022 ; Kreutzberg, 1996 ; Nishihara et al., 2020). Bien que ce mécanisme ne semble pas forcément mener à la suppression de l'épine dendritique, et qu'une réinnervation semble rester possible si elle est viable (Di Liberto et al., 2022 ; Perry and O'Connor, 2010), la fonction du stripping synaptique pourrait être de défaire un grand nombre de contacts synaptiques, rapidement, afin d'isoler le reste du tissu d'un dommage cellulaire (Di Liberto et al., 2022 ; Goda and Davis, 2003). Cependant, ce processus n'est que peu documenté et ne semble pas participer au développement du SNC.

L'élagage synaptique

Le développement cérébral normal nécessite la formation d'un grand nombre de synapses, puis le raffinement de certaines d'entre elles au cours d'un processus appelé l'élagage synaptique. Contrairement au stripping synaptique, l'élagage synaptique est un processus ayant lieu avant tout au cours du développement, dans des conditions physiologiques (Paolicelli et al., 2011). C'est un mécanisme finement régulé qui intervient à des fenêtres de temps spécifiques du développement de chaque structure cérébrale. Le raffinement de ces synapses est dépendant de l'activité et de l'expérience (Bastrikova et al., 2008 ; Hua and Smith, 2004), de signaux pré- et post-synaptiques (Bear et al., 1990 ; Colonnese and Constantine-Paton,

2006), et est médié par la microglie (Favuzzi et al., 2021 ; Paolicelli et al., 2011). Plusieurs acteurs moléculaires interviennent dans ce processus : notamment la phosphatidylsérine, la protéine C1q et la signalisation iC3b – CR3.

La phosphatidylsérine (PS) est un des phospholipides constitutifs de la membrane cellulaire. Cette dernière est constituée de deux couches : une couche externe (exoplasmique) et une couche interne (cytoplasmique). Au sein des membranes des cellules saines, la PS est principalement retrouvée au sein du feuillet interne (Hankins et al., 2015 ; Segawa and Nagata, 2015). Son externalisation, médiée par des scramblases et la caspase 3, est considérée comme un marqueur d'apoptose ou de nécroptose, et un signal « *eat-me* » attirant les macrophages pour une dégradation (Fadok et al., 2001). Iram et *al.* suggèrent que la phagocytose des cellules apoptotiques et l'élagage synaptique partagent des mécanismes similaires (Iram et al., 2016). L'externalisation de la PS serait ainsi impliquée dans l'élagage synaptique dépendant des cellules microgliales (Scott-Hewitt et al., 2020 ; Sokolova et al., 2021) : la PS est exposée aux synapses *in vivo* par un mécanisme indépendant des caspases 3 et les cellules microgliales englobent du matériel membranaire la contenant (Scott-Hewitt et al., 2020). Le lien entre activité neuronale et externalisation de la PS à la synapse n'est, à ce jour, pas établi. Une hypothèse est que la mitochondrie, en tant que senseur de l'activité neuronale, pourrait être impliquée dans ce processus (Sokolova et al., 2021). L'étude de l'englobement par la microglie de matériels membranaires incluant la PS chez des souris *knock-out* pour C1q (C1q^{-/-}) âgées de cinq jours a révélé une réduction de la quantité de PS englobée et une augmentation du pourcentage de sites présynaptiques VGLUT2+ marqués par la PS (Scott-Hewitt et al., 2020).

La protéine C1q appartient au système du complément. Elle participe à l'établissement du complexe protéique C1 également composé des protéases C1s et C1r, et dont l'activation dépend de la fixation de C1q sur son substrat (Presumey et al., 2017). Principalement générée par les cellules microgliales (Fonseca et al., 2017) (et dans une moindre mesure les astrocytes et les neurones (Druart and Le Magueresse, 2019)), la protéine C1q est localisée à la synapse au sein du SNC en développement (Stevens et al., 2007) et pourrait notamment se fixer sur la PS externalisée (Païdassi et al., 2008). L'activation du complexe C1q amorce localement la « cascade » de la voie classique du complément. C1q permet le clivage de la protéine du complément 2, C2 et la protéine du complément 4, C4, dont les produits de clivage C4b et C2b s'assemblent pour former la C3 convertase. Cette dernière clive la protéine C3 en deux morceaux : l'anaphylatoxine C3a et la protéine C3b (Druart and Le Magueresse, 2019). Un

fragment protéique de C3b, iC3b marque les synapses à éliminer (Stevens et al., 2007). Les microglies sont des acteurs importants dans l'élagage synaptique. Il s'agit de l'unique type cellulaire cérébral qui exprime le récepteur de iC3b, CR3. Les microglies reconnaissent, grâce à la signalisation iC3b – CR3, les afférences présynaptiques marquées, avant de les phagocyter et de les éliminer (Druart and Le Magueresse, 2019 ; Schafer et al., 2012) (Figure 28). Ainsi, l'ablation génétique de C1q chez la souris induit une augmentation de l'activité synaptique excitatrice accompagnée de crises épileptiques (Chu et al., 2010). De plus, le *knock-out* de CR3 entraîne des défauts de connectivité synaptique (Schafer et al., 2012). Le second produit du clivage de C3 est C3a. C3a a pour récepteur C3aR qui est exprimé par les microglies, les astrocytes et les neurones. Cette signalisation C3a – C3aR favorise l'activation microgliale et la perte de synapses dans un modèle de tauopathie (Litvinchuk et al., 2018).

L'élagage synaptique supprime des synapses par l'engloutissement du site pré-synaptique (et post-synaptique (Park et al., 2021), bien que cet effet soit moins bien documenté) par la microglie. Cependant, les neurones pré- et post-synaptique peuvent rester connectés par d'autres synapses : l'élagage synaptique permettrait ainsi une modulation de la force de la connectivité au sein du réseau existant (Goda and Davis, 2003). Il permet de maintenir et de renforcer spécifiquement les connexions neuronales les plus actives, en éliminant les autres (Schafer et al., 2012).

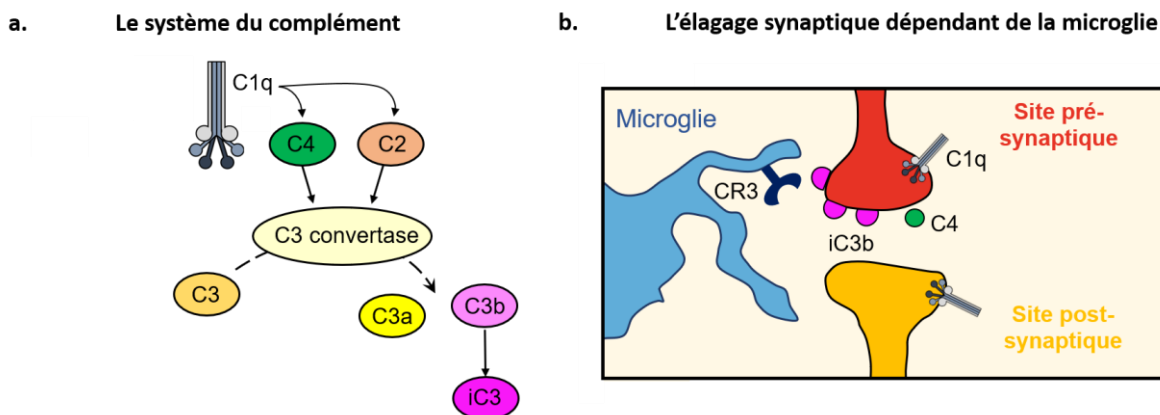


Figure 28. L'élagage synaptique dépendant du système du complément et de la microglie. (a) Les principales étapes et protéines de la voie classique du système du complément. (b) Par l'expression du récepteur de iC3b (CR3), la microglie reconnaît les synapses à éliminer. Notons la présence de différentes protéines du système du complément à la synapse.

Adaptée de Druart and Le Magueresse (2019)

Les fonctions microgliales développées ici ne forment pas une liste exhaustive. En effet, d'autres fonctions dans le développement du SNC sont attribuées à la microglie comme l'induction de l'apoptose développementale, la dégradation des déchets cellulaires ou encore l'activation et la croissance des astrocytes (Wright-Jin and Gutmann, 2019).

Pour conclure, la microglie intervient dans la mise en place et le maintien du SNC. Et permet un contrôle du bon développement cérébral. Une communication bidirectionnelle neurones – microglie semble s'établir et être absolument nécessaire au maintien d'un SNC sain : les neurones signalent leur statut aux cellules microgliales, et ces dernières sondent leurs signaux avant d'engager une réponse.

La grande majorité des études sur le développement de la microglie et de ses fonctions concernent des structures cérébrales telles que les cortex cérébraux, le système visuel (corps géniculé latéral du thalamus notamment), l'hippocampe et éventuellement le striatum. Les travaux concernant le mésencéphale et la VTA sont beaucoup plus rares.

Enfin, la compréhension des phénomènes développementaux permettant l'établissement d'un SNC mature et sain est particulièrement importante dans l'étude de l'étiologie de désordres neurodéveloppementaux et neuropsychiatriques.

III. L'activation immunitaire maternelle durant la grossesse, un facteur de risque associé à des désordres neuropsychiatriques

1. L'activation immunitaire maternelle

L'activation immunitaire maternelle (MIA pour « *Maternal Immune Activation* ») durant la grossesse se caractérise par la réponse inflammatoire induite chez la mère en réponse à un facteur infectieux ou non-infectieux. En particulier, les agents pathogènes tels que les bactéries, les virus et les parasites peuvent provoquer une MIA. La MIA expose le fœtus à une inflammation prénatale pouvant altérer son développement et finalement augmenter sa susceptibilité à contracter des pathologies neuropsychiatriques tels que la schizophrénie ou les troubles du spectre de l'autisme (TSA) (Knuesel et al., 2014 ; Meyer, 2019) (Figure 29).

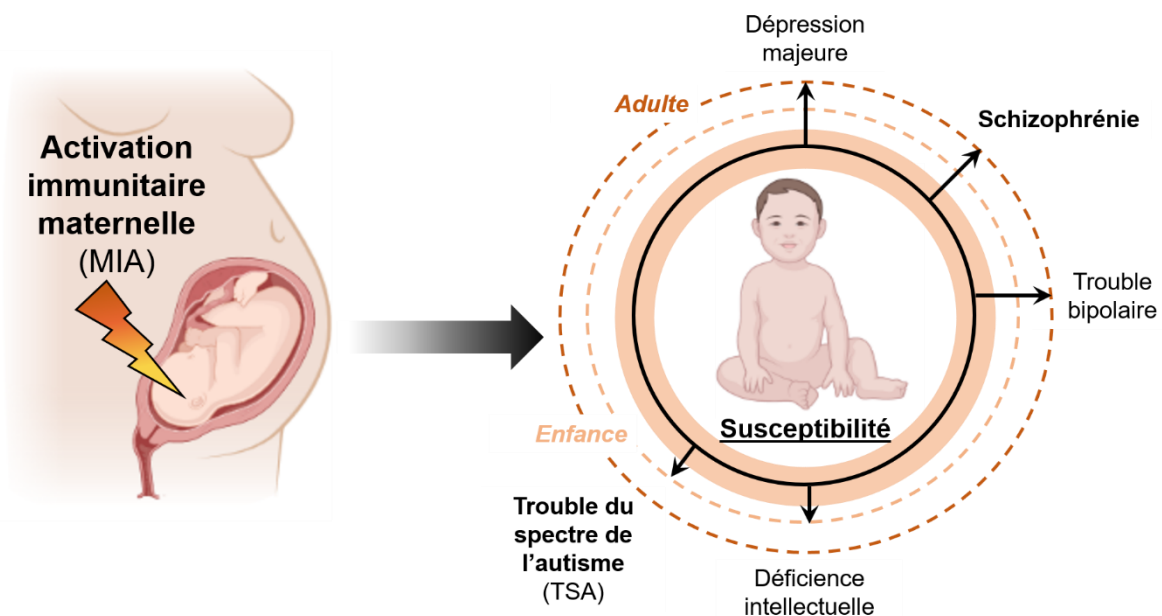


Figure 29. L'exposition prénatale à une activation immunitaire maternelle (MIA) augmente la susceptibilité de l'enfant à développer un trouble psychiatrique tel que la schizophrénie ou les troubles du spectre de l'autisme (TSA). Les conséquences neurodéveloppementales consécutives à une MIA sont larges, menant à l'apparition de divers troubles psychiatriques qui peuvent se déclarer à des âges / stades développementaux différents entre l'enfance et l'âge adulte (comme indiqué par les flèches noires, et les cercles en pointillés). Schéma créé à l'aide de BioRender.com

Adaptée de Knuesel et al. (2014) et Meyer (2019)

1) Agents infectieux et mécanismes d'action

i. Virus, bactéries et parasites

De nombreux agents pathogènes, lorsqu'impliqués dans une MIA, sont associés à un risque accru de schizophrénie ou de TSA chez les descendants de mères infectées. Une liste non exhaustive est présentée dans le Tableau 3 ci-dessous.

Agents infectieux	Associations	Auteurs
<i>Virus à ARN</i>		
Virus influenza (<i>grippe</i>)	Schizophrénie	(Brown et al., 2004 ; Fuller Torrey et al., 1988 ; Kendell and Kemp, 1989 ; Kunugi et al., 1992 ; McGrath et al., 1994 ; Mednick et al., 1994, 1988 ; Menninger, 1926 ; O'Callaghan et al., 1991 ; Watson et al., 1984)
Poliovirus (<i>polyomyélite</i>)	Schizophrénie	(Fuller Torrey et al., 1988 ; Suvisaari et al., 1999)
Virus de la rougeole	Schizophrénie	(Fuller Torrey et al., 1988)
	TSA	(Singh et al., 1998 ; Singh and Jensen, 2003)
Virus ourlien (<i>oreillons</i>)	Schizophrénie	(O'Callaghan et al., 1994)
Virus de la rubéole	Schizophrénie	(Brown et al., 2001, 2000)
	TSA	(Chess et al., 1978 ; Deykin and Macmahon, 1979 ; Hutton, 2016)
<i>Virus à ADN (herpèsvirus)</i>		
Virus de la varicelle-zona	Schizophrénie	(Fuller Torrey et al., 1988 ; O'Callaghan et al., 1994)
Virus de HSV-2 (<i>herpès</i>)	Schizophrénie	(Brown, 2006 ; Buka et al., 2008, 2001 ; Mortensen et al., 2010)
	TSA	(Mahic et al., 2017)
Cytomégalovirus	TSA	(Ivarsson et al., 1990 ; Markowitz, 1983 ; Stubbs et al., 1984 ; Sweeten et al., 2004)
<i>Bactéries</i>		
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (<i>diphthérie</i>)	Schizophrénie	(Fuller Torrey et al., 1988 ; Watson et al., 1984)
Streptocoque du groupe A (<i>scarlatine, fièvre rouge</i>)	Schizophrénie	(Fuller Torrey et al., 1988)
<i>Parasite</i>		
<i>Toxoplasma gondii</i>	Schizophrénie	(Brown et al., 2005 ; Mortensen et al., 2010 ; Sutterland et al., 2015 ; Torrey et al., 2007 ; Xiao et al., 2009)

Tableau 3. Associations entre pathogènes responsable d'une MIA et schizophrénie ou TSA. Parmi les agents infectieux identifiés comme impliqués dans des MIA qui élèvent le risque de présenter une schizophrénie ou des TSA pour l'enfant, on retrouve des virus à ARN et à ADN, des bactéries et un parasite.

Adapté de Aguilar-Valles et al. (2020), Brown and Derkits (2010), Ciaranello and Ciaranello (1995), Libbey et al. (2005)

L'ensemble de ces données (Tableau 3) indique qu'un agent pathogène spécifique impliqué dans la MIA ne détermine pas le type de pathologie neuropsychiatrique qui peut éventuellement se développer chez l'enfant, mais de manière générale induit une inflammation prénatale à laquelle est exposée l'enfant via l'infection contractée par la mère durant la grossesse. Puisque cette inflammation prénatale cause une susceptibilité accrue à plusieurs pathologies neuropsychiatriques (comme la schizophrénie et les TSA), la MIA ne détermine pas à elle seule la présence ou le type de symptômes neuropsychiatriques chez la descendance. La MIA pourrait ainsi constituer un facteur de risque dont les conséquences dépendent de la fenêtre développementale pendant laquelle elle intervient ainsi que de son association à d'autres facteurs environnementaux et/ou génétiques.

ii. De la mère à l'enfant : quels sont les médiateurs ?

L'agent pathogène lui-même

Un certain nombre de maladies infectieuses peuvent être transmises aux femmes enceintes et atteindre le fœtus induisant ainsi une MIA. Ces infections, collectivement appelées infections « TORCH », comprennent la toxoplasmose, d'autres (par exemple, la syphilis, le VIH, la varicelle, les oreillons), la rubéole, le cytomégalovirus et le virus de l'herpès simplex. En effet, les agents pathogènes responsables de ces infections (des virus et des parasites) sont capables de **traverser le placenta** et d'atteindre le fœtus, comme en atteste la présence de l'agent pathogène ayant infecté la mère chez le nouveau-né. Cette atteinte au cours de la vie prénatale et très tôt au cours du développement post-natal peut causer un certain nombre d'invalidités et de malformations congénitales comme de la surdité, des problèmes ophtalmiques (cataracte, opacité cornéenne, glaucome), des problèmes cardiaques (sténose artérielle par exemple), de l'épilepsie et également des désordres comportementaux chez le jeune enfant (Neu et al., 2015) (Figure 30).

L'interface mère – fœtus est formée par le placenta, un organe éphémère qui permet des échanges métaboliques entre la femme et son enfant. Le placenta est formé (1) d'un tissu de l'endomètre maternel (*decidua*) comprenant des cellules déciduales utérines ainsi que des cellules de l'immunité maternelle (macrophages, cellules dendritiques et cellules NK) et (2) d'un tissu fœtal trophoblastique (*placental villus*) comprenant un grand nombre de vaisseaux sanguins et de macrophages fœtaux (Racicot and Mor, 2017). Parmi ses nombreuses fonctions (nutritive, respiratoire, excrétrice...), le placenta joue un rôle immunitaire, formant une barrière

de protection pour le fœtus en développement dont l'environnement est ainsi strictement contrôlé. Le placenta évolue durant la grossesse, exprimant différents récepteurs et adaptant sa perméabilité aux besoins développementaux. Malgré le rôle protecteur de l'activation immunitaire maternelle, les agents pathogènes peuvent parfois atteindre le placenta en remontant le tract génital ou via la circulation sanguine. L'ensemble des mécanismes mis en jeu par certains pathogènes pour briser les barrières immunitaires, traverser le placenta et atteindre le fœtus reste mal compris (Hussain et al., 2022). Il semble cependant que l'entrée des agents pathogènes au sein du fœtus dépende d'un grand nombre de facteurs incluant l'agent infectieux et sa pathogénicité, la réponse immunitaire maternelle, ainsi que le stade de développement et la perméabilité placentaire associée (Racicot and Mor, 2017). Lorsqu'un pathogène atteint l'organisme du fœtus, il rencontre un système immunitaire immature. Cependant, dès 17 spf, les cellules dendritiques fœtales sont capables de reconnaître des patterns / dommages moléculaires associés à des pathogènes (PAMPs/DAMPs) et via les signalisations TLRs, libèrent des facteurs pro-inflammatoires dont l'IL-6 (McGovern et al., 2017). Ainsi, dès le second trimestre de vie intra-utérine, le système immunitaire fœtal est capable d'initier une réponse immunitaire. Cependant, son efficacité demeure limitée et l'entrée du pathogène est susceptible de compromettre le développement de l'enfant.

Bien que la barrière placentaire puisse être franchie par certains virus et parasites, sa traversée par des agents pathogènes reste exceptionnelle. Ainsi, l'hypothèse fréquemment avancée pour expliquer les effets d'une MIA sur le développement prénatal de l'enfant et ses conséquences post-natales est que des cytokines pro-inflammatoires passent de la mère au fœtus.

L'hypothèse des cytokines

La réponse à l'infection chez la mère enceinte met en jeu l'immunité innée et fait intervenir les phagocytes et les lymphocytes qui, pour organiser la défense de l'organisme, libèrent des cytokines pro-inflammatoires. Par la détection des PAMPs et des DAMPs, au moyen de leurs récepteurs *Toll-like* (TLR), les phagocytes sont responsables de la production d'IL-6 et de TNF- α (Dantzer, 2009). De plus, les lymphocytes T (notamment les « *T helper 17* », Th17) sécrètent l'interleukine 17a (IL-17a) (McGeachy et al., 2019) (Figure 30). Des études *ex vivo* sur placenta humain ont révélé que les cytokines maternelles (IL-6 principalement) peuvent atteindre le fœtus (Zaretsky et al., 2004). Ces observations sont

confirmées chez la souris où la perméabilité du placenta pour cette cytokine est plus importante à la mi-gestation (E11-E13) qu'en fin de gestation (E17-E19) (Dahlgren et al., 2006). Les modèles de MIA chez le rongeur ont permis de mettre en cause l'IL-6 et l'IL-17a dans les conséquences de la MIA. En effet, l'induction d'une MIA chez la souris lors de la deuxième semaine de gestation cause, chez les petits exposés, des déficits comportementaux qui ne sont plus observés lorsque des anticorps neutralisants l'IL-6 sont coadministrés (Smith et al., 2007). De la même manière, l'administration d'anticorps ciblant l'IL-17a deux jours après l'induction de la MIA par injection de Poly(I:C) à la femelle gestante a des effets thérapeutiques (Choi et al., 2016). De plus, l'injection d'IL-6 ou d'IL-17a à la femelle gestante induit des effets comportementaux aux petits exposés comparables à lors d'une MIA (Choi et al., 2016 ; Smith et al., 2007). *A contrario*, dans un modèle murin de MIA, l'augmentation de l'expression de l'interleukine 10 (IL-10), une cytokine anti-inflammatoire, par les macrophages de la mère contrebalance les effets de la MIA sur le comportement des petits exposés (Meyer et al., 2008). Dans le cerveau des embryons, la MIA à E9 augmente les niveaux d'IL-6 sans changer ceux d'IL-10, causant de ce fait une augmentation significative du ratio IL-6 / IL-10 (Meyer et al., 2008). Les altérations pathologiques du développement du cerveau de l'enfant suite à une MIA pourraient ainsi résulter d'un déséquilibre de la « balance cytokinique » (Meyer, 2006 ; Meyer et al., 2008). Ces altérations de la balance cytokinique pourraient être persistantes, puisque le cerveau de patients souffrant de TSA présente une expression élevée d'IL-6 (Garbett et al., 2008 ; Vargas et al., 2005). Dans le sérum de patients schizophrènes, les niveaux d'IL-6 sont augmentés (Potvin et al., 2008) et peuvent l'être également dans le liquide cérébro-spinal (Garver et al., 2003). Finalement, puisque les cellules microgliales expriment le récepteur de l'IL-17a (IL-17Ra) (Sarma et al., 2009) et que l'IL-6 est un modulateur de l'activité microgliale (comme vu précédemment), la microglie pourrait jouer un rôle central dans les conséquences de la MIA sur le développement du cerveau.

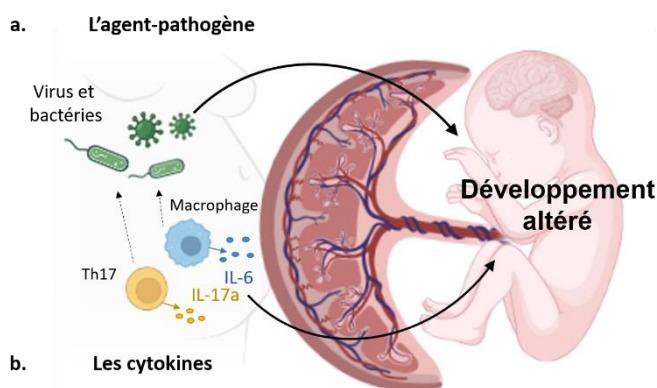


Figure 30. La MIA, de la mère à l'enfant.

(a) Certains virus semblent pouvoir traverser le placenta et atteindre le fœtus compromettant ainsi son bon développement. (b) Les macrophages et lymphocytes (Th17) sécrètent des cytokines (IL-6 et IL-17a) qui passent le placenta et altèrent le développement fœtal. Schéma créé à l'aide de BioRender.com.

Adaptée de Kassotaki et al. (2021)

2) L'activation immunitaire maternelle, un facteur de risque : l'exemple du virus de la grippe asiatique et de la schizophrénie

Les études épidémiologiques menées à la suite d'épidémies majeures et de pandémies ont permis de démontrer le lien entre infections prénatales et pathologies psychiatriques chez la descendance. Dès 1926, il a été suggéré que le virus de la grippe (« *influenza virus* ») pourrait être impliqué dans l'étiologie de certaines psychoses comme notamment la schizophrénie (Menninger, 1926). En 1957, le monde connaît une pandémie (la grippe asiatique) causée par le virus de la grippe A (H2N2). L'étude des répercussions de cette pandémie sur les naissances en Finlande, l'année suivante, a révélé que l'exposition au virus de la grippe A (H2N2) au cours du premier trimestre de la grossesse augmente le risque de malformations congénitales (Saxen et al., 1960). Mednick et al. ont observé que le risque de développer une maladie neurologique / neuropsychiatrique est augmenté chez les personnes nées quelques mois après la pandémie (Mednick et al., 1988). Ce risque est d'autant plus marqué si la pandémie a eu lieu au cours du second trimestre de leur vie prénatale (Mednick et al., 1988). Une étude des conséquences de cette pandémie sur le devenir des jeunes adultes l'ayant vécu *in utero* a également été faite en Ecosse et en Angleterre (Kendell and Kemp, 1989), ainsi qu'aux Etats-Unis (Bowler and Torrey, 1990). Alors que l'étude faite sur les cohortes anglaises et américaines ne s'est pas révélée concluante, celle réalisée sur une cohorte écossaise a montré que le risque de schizophrénie chez les descendants est augmenté si une infection s'est déclarée chez la mère au cours du sixième mois de grossesse, et éventuellement au cours des septième et huitième mois (Bowler and Torrey, 1990 ; Kendell and Kemp, 1989). En 1991, une autre étude réalisée sur des cohortes de patients d'Angleterre et du Pays de Galles confirme que l'exposition au virus de la grippe A (H2N2) au cours du second trimestre de vie *in utero* augmente le risque de développer une schizophrénie pour les populations concernées par ces travaux (O'Callaghan et al., 1991). Les études portant sur les conséquences de la pandémie de 1957 ont continué en Croatie (Erlenmeyer-Kimling et al., 1994), aux Pays-Bas (Selten and Slaets, 1994), au Japon (Kunugi et al., 1992) et en Australie (McGrath et al., 1994), et une méta-analyse est publiée en 2010 (Selten et al., 2010). Cependant, ces études ne sont pas unanimes au sujet de l'association ou non entre MIA et risque augmenté de schizophrénie (Tableau 4).

Références	Pays	Cohorte	Diagnostic	Association
(Mednick et al., 1988)	Finlande	→ Patients (+ de 26 ans) d'hôpitaux psychiatriques de la régions d'Usimaa : 216 exposés à l'épidémie et 1 565 cas contrôles	Dès une admission et un diagnostic posé selon une adaptation de l'ICD (7 ^{ème} et 8 ^{ème} versions)	2nd trimestre
(Kendell and Kemp, 1989)	Registre d'Édimbourg	→ <i>Edinburgh Psychiatric Case Register</i> : 122 cas d'exposition contre 210 cas contrôles	Lors de la plus récente évaluation (admission) du patient et selon l'ICD (9 ^{ème} révision)	2nd - 3^{ème} trimestre (6 ^{ème} , 7 ^{ème} , 8 ^{ème} mois)
	Ecosse	→ Admission en hôpitaux psychiatriques en Ecosse (<i>Scottish national data</i>) : 227 cas d'exposition et 525 sujets non-exposés (contrôles)		<i>none</i>
(O'Callaghan et al., 1991)	Royaume-Uni (Angleterre et Pays de Galle)	→ 339 patients exposés et dont le premier diagnostic est posé entre 1976 et 1986, et 1 331 patients non-exposés (contrôles) nés dans en 1955, 1956, 1958, 1959	Dès une admission et un diagnostic posé selon l'ICD (8 ^{ème} et 9 ^{ème} versions)	2nd trimestre (5 ^{ème} mois)
(Kunugi et al., 1992)	Japon	→ 147 patients schizophrènes exposés et 689 non-exposés (contrôles) nés entre en 1955, 1958, 1959, 1960.	« Hospital diagnosis was used. »	2nd trimestre (entre le 3 ^{ème} et le 6 ^{ème} mois)
(Erlenmeyer-Kimling et al., 1994)	Croatie	→ 348 patients hospitalisés exposés nés entre 1956 et 1957 et 1 468 non-exposés (contrôles) nés en 1955, 1957, 1959 ou 1960.	Selon l'ICD (7 ^{ème} à 9 ^{ème} versions)	<i>none</i>
(McGrath et al., 1994)	Australie	→ 7 858 patients du <i>Queensland public hospital</i> entre 1972 et 1988	Selon l'ICD (8 ^{ème} ou 9 ^{ème} versions)	2nd trimestre (↑ des naissances de futurs patients schizophrènes 5 mois après le pic de la pandémie)
(Mednick et al., 1994)	Finlande	→ 25 patients nés à Helsinki entre 1957 et 1958 diagnostiqués schizophrènes et dont la mère est tombée malade	Non précisé	2nd trimestre

		(vraisemblablement de la grippe) pendant sa grossesse		
(Selten and Slaets, 1994)	Pays-Bas	→ <i>Dutch psychiatric registry</i> : patients admis en hôpital psychiatrique entre 1978 et 1991 pour schizophrénie dont 873 exposés nés entre 1957 et 1958 et 3 761 non-exposés (contrôles) nés entre 1955-1957 et 1958-1960	Selon l'ICD (9 ^{ème} version)	<i>none</i>
(Susser et al., 1994)	Pays-Bas	→ <i>Dutch psychiatric registry</i> : patients de l'hôpital entre 1956 et 1960 et âgés de 22 à 31 ans ; dont 180 patients exposés (nés en 1958) et 203 patients schizophrènes non-exposés (contrôles, nés en 1956, 1957, 1959 et 1960)	Selon l'ICD (9 ^{ème} version)	<i>none</i>

Tableau 4. Principales études ayant examiné l'association entre exposition *in utero* à la grippe A (H2N2) et développement d'une schizophrénie. ICD : « *International Classification of Disease* », classification médicale internationale des maladies.

Adapté de Brown and Derkits (2010)

Il est possible que les différences de résultats obtenus s'expliquent par le fait que de nombreux paramètres pouvant moduler les conséquences d'une MIA ne sont pas pris en compte dans ces études. Tout d'abord, la MIA dépend avant tout de **la réponse immunitaire de la mère** à l'agent déclenchant, ici le virus de la grippe A (H2N2). Cette réponse est conditionnée par le profil génétique de la mère, et elle l'est également par l'historique immunitaire et les éventuelles précédentes rencontres avec un tel virus. Il est aussi possible que l'infection virale ne soit pas toujours déclarée par la mère lors des entretiens médicaux, surtout si elle ne conduit pas à des complications et une nécessité d'hospitalisation pendant la grossesse. De plus, la prise en charge de la maladie et la médication qui peut être, ou non, prescrite à la mère pendant la grossesse est un modulateur envisageable des conséquences sur l'enfant (Susser et al., 1994). Par ailleurs, l'historique familial et les antécédents de maladies psychiatriques ne sont pas pris en compte dans la plupart des études épidémiologiques. Par exemple, une étude suédoise sur une cohorte de presque deux millions d'individus a établi que le risque de développer une psychose suite à l'exposition à une MIA est réel si l'un des parents possède un historique psychiatrique (Blomström et al., 2015). Ensuite, **le timing** auquel l'infection a lieu lors de la

grossesse est majeur. Cette notion de temps s'explique par le fait que la perméabilité placentaire change au cours du développement et que la réponse immunitaire fœtale peut également évoluer selon le stade développemental (Meyer, 2006). Dans le cas de la schizophrénie et du virus de la grippe, la majorité des études ont montré que le 2nd trimestre représente une fenêtre de risque accru face au développement de la maladie. Il est aussi possible que le **diagnostic de la maladie** – ici la schizophrénie – diverge selon les pays, les années (et les connaissances médicales qu'elles apportent) ainsi que les personnels de santé, compliquant donc les études comparatives entre populations/pays. De plus, les données répertoriées ne concernent que des patients hospitalisés. Enfin, ces études ne prennent pas en compte **la vie des patients, de leur naissance à leur diagnostic**. En effet, l'hypothèse principale est que la MIA constitue un facteur de risque augmentant la susceptibilité de déclencher la maladie. Ce serait alors la combinaison de facteurs environnementaux, ou leurs associations à des facteurs génétiques qui déclencheraient les troubles et maladies neuropsychiatriques.

2. Des désordres neuropsychiatriques associés à l'activation immunitaire maternelle : la schizophrénie et les troubles du spectre autistique

Alors que la schizophrénie est considérée comme une maladie complexe, les TSA sont reconnus comme des handicaps depuis 1996 en France (source : *Inserm*).

1) Données épidémiologiques

La schizophrénie, tout comme les TSA sont des désordres psychiatriques chroniques diagnostiqués, respectivement, au cours de l'adolescence ou dès la petite enfance. En France, selon l'Inserm, environ 1 300 000 personnes sont touchées par l'une de ces deux conditions (Tableau 5). En 2019, dans le monde, il est estimé que 23,6 millions de personnes sont atteintes d'une schizophrénie et 28,3 millions présentes un TSA. La schizophrénie et les TSA touchent à la fois les hommes et les femmes. Néanmoins, les hommes sont susceptibles de développer une schizophrénie plus invalidante que les femmes, et dans le cas des TSA, le ratio garçons/filles atteints est de 4 :1 (Lai et al., 2014).

	Prévalence	Âge de diagnostic	Sexe
Schizophrénie	→ 0,7 à 1% soit ~ 600 000 personnes en France	Entre 15 et 25 ans en moyenne	Hommes* et femmes * semblent présenter des formes plus précoces et plus invalidantes
TSA	→ 1% soit ~ 700 000 personnes en France dont ~100 000 jeunes de moins de 20 ans	1 ^{ers} signes peuvent remarqués entre 18 et 36 mois	Chez les enfants de 7 ans, les TSA sont 3,7 fois plus prévalents chez les garçons que chez les filles

Tableau 5. Données épidémiologiques concernant la schizophrénie et les TSA.

Source : www.inserm.fr

Dans la schizophrénie comme dans les TSA, des études familiales ont mis en évidence l'ampleur de la part de la génétique dans la susceptibilité face à ces troubles neurodéveloppementaux. L'héritabilité face à la schizophrénie est estimée à environ 80% (Cardno and Gottesman, 2000 ; Hilker et al., 2018). Le jumeau monozygote d'un individu atteint de schizophrénie a 40 à 50% de risque d'être lui-même atteint, et ce risque est de 60% dans le cas d'un TSA alors que la prévalence moyenne de ces deux pathologies au sein de la population n'est que de 0,7 à 1% (Bailey et al., 1995 ; Cardno and Gottesman, 2000 ; Rutter, 2000 ; Sullivan et al., 2003 ; Wong, 2001). Ce risque n'étant pas de 100%, la composante environnementale demeure significative.

2) Altérations cognitives, comportementales et cérébrales associées

Parmi l'ensemble des altérations cérébrales et atteintes cognitives et comportementales présentes chez les patients schizophrènes et les personnes atteintes d'un TSA, certaines sont communes. La compréhension de la physiopathologie de ces troubles neuropsychiatriques est encore limitée.

i. Atteintes cognitives et comportementales

La diversité des tableaux cliniques associés à la **schizophrénie** reflète la complexité de ce trouble psychiatrique : les symptômes dits cognitifs (troubles de la mémoire, mémoire de travail notamment, et de l'attention) sont souvent observables plusieurs années avant le diagnostic clinique de la maladie. Les symptômes positifs (hallucinations, idées délirantes) et

négatifs (retrait social, anhédonie, alogie, aboulie) apparaissent à l'adolescence ou chez le jeune adulte (Glausier and Lewis, 2013). Bien que la maladie soit décrite et caractérisée depuis plus d'un siècle, la compréhension de sa physiopathologie est encore limitée.

Les **TSA** regroupent un certain nombre de désordres neurodéveloppementaux (dont le syndrome d'Asperger et l'autisme de Kanner). Malgré la grande variété de profils autistiques, certaines caractéristiques comportementales sont retrouvées comme des difficultés à mener une vie sociale et à communiquer avec son prochain, des intérêts très spécifiques et restreints, ainsi que des comportements de répétitions prononcés (Lai et al., 2014).

Des altérations cérébrales spécifiques ont été observées chez les patients schizophrènes ou ceux atteints d'un TSA, notamment des défauts des signalisations DA et glutamatergique, des anomalies synaptiques et une inflammation persistante.

ii. Altérations du système dopaminergique

Les premières preuves de l'implication de la dopamine dans la **schizophrénie** sont issues des effets antipsychotiques de certaines drogues, comme la réserpine, qui vide les vésicules de stockage de la dopamine en inhibant son transporteur (Carlsson et al., 1957). L'hypothèse DA de la schizophrénie voit progressivement le jour en se basant sur plusieurs observations. La première est que la prise d'amphétamines à forte dose, dont les effets augmentent la dopamine extracellulaire (Calipari and Ferris, 2013), induit des symptômes psychotiques non distinguables de ceux caractéristiques de la schizophrénie (Connell, 1957). La seconde est que les drogues antipsychotiques (halopéridol, chlorpromazine, raclopride) sont des antagonistes des D₂R (Creese et al., 1976 ; Meltzer et al., 1989) et que chez les patients schizophrènes, la densité en D₂R est augmentée dans le NAcc (Cross et al., 1981 ; Crow et al., 1978). Cette dernière affirmation n'est cependant pas soutenue par certaines études d'imagerie médicale par tomographie par émissions de positons (PET pour « *positrons emission tomography* ») qui n'ont pas révélé de changements de la signalisation D₂R (Okubo et al., 1997). De plus, des résultats suggérant que les traitements antipsychotiques augmentent l'expression des D₂R ont alors fait naître des doutes quant à la réelle modification de leur densité par des mécanismes étiopathogéniques (Thompson et al., 2020). Enfin, ce n'est pas le nombre de D₂R qui pourrait être altéré dans le NAcc des patients schizophrènes mais leur oligomérisation (Seeman and Kapur, 2000), compliquant l'interprétation des images par PET,

et suggérant des changements fonctionnels des D₂R (Harrison, 2000). Néanmoins, l'hypothèse que l'hyperstimulation des D₂R au sein de la voie mésolimbique causerait les symptômes « positifs » de la maladie demeure. En parallèle, des études d'imagerie par PET chez des patients diagnostiqués schizophrènes ont révélé une diminution des D₁R au sein du PFC (Okubo et al., 1997), des récepteurs impliqués dans la mémoire de travail (Brozoski et al., 1979; Sawaguchi and Goldman-Rakic, 1991; Williams and Goldman-Rakic, 1995). Il convient de préciser que, là encore, toutes les études ne s'accordent pas sur une diminution des D₁R au sein du PFC (Karlsson et al., 2002 ; Knable et al., 1996). Toutefois, ces observations suggèrent qu'une altération de la signalisation D₁R au sein du PFC serait impliquée dans les symptômes négatifs et cognitifs de la pathologie. Finalement, l'hypothèse DA de la schizophrénie propose que les symptômes observés soient causés par une hyperactivité de la voie mésolimbique, et *a contrario*, une hypo-fonction de la voie méso-corticale. Il est possible que ces deux atteintes soient corrélées puisque le PFC projettent des afférences glutamatergiques sur le NAcc (Zhou et al., 2018) et que les neurones DA de la VTA ciblent ces deux régions cérébrales (Swanson, 1982).

Dans le contexte des **TSA**, des altérations de la signalisation DA sont aussi rapportées. Tout d'abord, une étude d'imagerie par PET a révélé que certains jeunes autistes (13-14 ans en moyenne) présentent une diminution de l'activité DA au sein de leur PFC antérieur médian, sans altération de cette activité dans d'autres régions cérébrales (VTA, SN, autres cortex) (Ernst et al., 1997). Ce résultat n'est cependant pas retrouvé chez des adultes autistes, chez lesquels Nieminen-von Wendt et *al.* rapportent une augmentation de la synthèse DA dans le cortex frontal (Nieminen-von Wendt et al., 2004). Néanmoins, la fixation du DAT par un radio-ligand le ciblant est augmentée dans le cortex orbitofrontal des patients autistes (Nakamura et al., 2010). Les résultats portant sur la distribution des D₁R ne sont pas conclusifs, possiblement à cause de la grande hétérogénéité des profils de patients atteints de TSA (Kubota et al., 2020). Dans le striatum, Nieminen-von-Wendt et *al.* ont montré une augmentation de la fonction DA (Nieminen-von Wendt et al., 2004) alors que Schallbroeck et *al.* n'observent aucun changement dans cette structure (Schallbroeck et al., 2021b, 2021a). L'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) durant des tâches d'apprentissage social impliquant une récompense a révélé des défauts d'apprentissages indépendants de la récompense chez des enfants diagnostiqués TSA, ainsi qu'une réponse neuronale réduite à la récompense indépendamment de l'apprentissage. De plus, les enfants autistes présentent une réduction de l'activation des

aires fronto-striatales dans un paradigme d'apprentissage social récompensé. Ces résultats suggèrent que ces enfants autistes n'intègrent pas les stimuli sociaux comme des récompenses (Scott-Van Zeeland et al., 2010). Plusieurs études s'accordent sur un dysfonctionnement du système de la récompense chez les personnes diagnostiquées TSA (Dichter et al., 2012 ; Scott-Van Zeeland et al., 2010). Finalement, Pavál propose une hypothèse DA aux TSA, se basant sur le fait que la dopamine, notamment via les voies méso-corticale et mésolimbique, est impliquée dans les comportements altérés dans les TSA, dont les mécanismes de récompense ou de motivation associées aux actions (Pavál, 2017). Selon lui, des altérations de la signalisation DA méso-cortico- limbique pourrait empêcher la définition des interactions sociales comme une expérience positive, « récompensante », et ainsi réduire la motivation à poursuivre de tels échanges et les capacités de ces individus à s'intégrer socialement.

iii. Altération de la signalisation glutamatergique

L'hypofonction de la transmission glutamatergique spécifiquement portée par les NMDA_R est également une altération associée à la **schizophrénie**. Elle est suggérée par :

- L'apparition de symptômes psychotiques suite à l'ingestion d'antagonistes de ces récepteurs (par exemple la phéncyclidine et sa dérivée kétamine) (Beck et al., 2020 ; Krystal et al., 2005) ;
- L'association faite par plusieurs études d'associations et méta-analyses entre un polymorphisme nucléotidique (SNP) du gène codant pour la sous-unité NR2A du NMDA_R et la schizophrénie (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014; Singh et al., 2022; Tarabeux et al., 2011; Trubetskoy et al., 2022) et le fait que les variants génétiques rares conduisant à l'expression d'une protéine NR2A tronquée augmentent fortement le risque de schizophrénie (Singh et al., 2022), et enfin par ;
- Les troubles psychotiques chez les patients ayant une maladie auto-immune anti-NMDA_R (Hammer et al., 2014).

Cette altération de la fonction des NMDA_R peut s'expliquer par une dysrégulation de leur activité (Gonzalez-Burgos and Lewis, 2012) ou une diminution de leur nombre aux synapses fonctionnelles (Catts et al., 2015). Ces observations concernent principalement le cortex, ainsi il est admis que la schizophrénie soit associée à une hypo-fonction corticale.

Concernant l'implication de la signalisation glutamatergique dans les symptômes associés aux **TSA**, deux hypothèses sont formulées :

- La première est la « *hypoglutamate theory* » par Carlsson (Carlsson, 1998).

Observant que certaines structures impliquées dans l'étiologie des TSA sont des régions cérébrales riches en neurones glutamatergiques (cortex, HPC, amygdale), Carlsson suggère que les TSA seraient causés par une diminution de la signalisation glutamatergique au sein de ces structures. Pour formuler cette hypothèse, il se base sur les similarités entre les effets d'une prise d'inhibiteurs des NMDAR (phéncyclidine, kétamine, LSD) et certains symptômes de l'autisme comme la dépersonnalisation. Une comparaison est faite par Carlsson entre les symptômes négatifs et cognitifs caractéristiques de la schizophrénie et ceux associés à l'autisme, renforçant la théorie hypo-glutamatergique des TSA (Carlsson, 1998). Cette hypothèse est également soutenue par le fait que l'administration de D-Cyclosérine, un agoniste partiel du site de la glycine des NMDAR, à des patients autistes améliorent leurs compétences sociales (Sweeten et al., 2004 ; Urbano et al., 2015 ; Wink et al., 2017) et atténuent les comportements stéréotypiques (Urbano et al., 2014) chez les adolescents et jeunes adultes.

- La seconde hypothèse est la « *hyperglutamate theory* » par Fatemi (Fatemi, 2008).

Cette hypothèse se base principalement sur l'augmentation de glutamate dans le sérum et le plasma retrouvée chez des personnes autistes, durant l'enfance et chez les adultes (Zheng et al., 2016). Puisque les niveaux de glutamate dans le sang sont corrélés positivement à ceux au sein du liquide céphalorachidien (Alfredsson et al., 1988), une dérégulation du métabolisme glutamatergique serait impliquée dans l'étiologie de ces troubles. De plus, une diminution des niveaux d'ARN messager (ARNm) de GAD65, qui convertit le glutamate en GABA, a été constatée au sein du cerveau de personnes autistes (Yip et al., 2009). Enfin, une activité épileptique est observée dans certains cas de TSA (Lukmanji et al., 2019), et pourrait refléter une augmentation des niveaux de glutamate (Chen et al., 2022). Pour finir, plusieurs revues rappellent les associations faites entre des défauts génétiques codant pour une altération de la signalisation glutamatergique (et, des NMDAR) avec les TSA (Deutsch et al., 2022 ; Eltokhi et al., 2020 ; Mangano et al., 2022 ; Montanari et al., 2022 ; Nisar et al., 2022 ; Tarabeux et al., 2011).

iv. Anomalies synaptiques

Certaines anomalies synaptiques sont des phénotypes robustes de la **schizophrénie**. Plusieurs études génétiques ont révélé le risque associé à certains polymorphismes génétiques (perte de fonction, et non-sens) de gènes codant pour les protéines de la densité post-synaptique glutamatergique, notamment PSD-95 (« *post-synaptic density protein 95* ») (Purcell et al., 2014), ARC (« *activity-regulated cytoskeleton-associated protein* ») (Fromer et al., 2014 ; Purcell et al., 2014), mais aussi les NMDA_R (Fromer et al., 2014). De plus, des études génétiques (GWAS) ont montré l'association de plusieurs gènes du système du complément, acteur de l'élagage synaptique dépendant des cellules microgliales, à un risque accru de présenter une schizophrénie. Il s'agit notamment du gène *Csmd1* (Schizophrenia Psychiatric GWAS Consortium et al., 2011), intervenant dans la régulation du complément, ainsi que le gène du complément C4 (Sekar et al., 2016). Notamment, une augmentation des niveaux de l'ARN de certaines formes du gène C4 est retrouvée dans le cerveau des patients schizophrènes *post-mortem* (Sekar et al., 2016). D'autres travaux sur du tissu *post-mortem* de patients schizophrènes ont révélé une réduction de l'immuno-réactivité de la synaptophysine au sein du PFC (Glantz and Lewis, 1997) et de son expression au sein de l'HPC (Matosin et al., 2016), une diminution de l'expression de la PSD-95 dans l'HPC (Matosin et al., 2016) ainsi qu'une diminution de la densité d'épines dendritiques dans le cortex (Garey et al., 1998 ; Glantz and Lewis, 2000) (Figure 31). En 2020, une étude utilisant de l'imagerie PET a montré que des altérations synaptiques peuvent être mises en évidence *in vivo* chez des patients schizophrènes (Onwordi et al., 2020). Ensemble, ces observations suggèrent une altération de la connectivité synaptique au sein du cerveau des personnes atteintes de schizophrénie, et que cette atteinte synaptique touche particulièrement la signalisation excitatrice (DeFelipe and Fariñas, 1992 ; Glantz and Lewis, 2000). Ainsi cette perte de synapses glutamatergiques pourrait refléter une

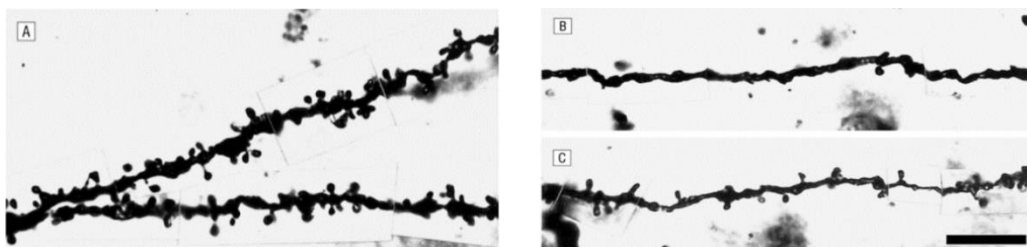


Figure 31. Dendrites basilaires imprégnées de Golgi de neurones pyramidaux de la couche 3 du PFC latéro-dorsal d'un sujet contrôle (A) et de deux sujets atteints d'une schizophrénie (B et C). Echelle : 10 μ m. Source : Glantz and Lewis (2000)

augmentation de l'élagage synaptique, mécanisme grâce auquel les synapses surnuméraires sont éliminées au cours de la maturation du cerveau, ou un défaut du turn-over des synapses glutamatergiques.

Dans le contexte des **TSA**, il a été proposé qu'une altération pathologique de la balance excitation / inhibition pourrait causer certains symptômes observés : en effet, environ 10 à 30% des personnes autistes sont épileptiques (Besag, 2017 ; Tuchman et al., 2010). Un chevauchement existe entre la perte de fonction de gènes impliqués dans la fonction synaptique associée à la schizophrénie et les pertes de fonctions génétiques associées aux TSA (Fromer et al., 2014). De plus, de nombreux modèles de TSA chez le rongeur ont été générés par *knock-out* de gènes codant pour des molécules d'adhésion synaptique (comme les neurexines ou les neuroligines) ou des protéines d'échafaudage synaptique (comme *Shank3*) (de la Torre-Ubieta et al., 2016), associés aux TSA. Ces modèles ont permis de relier anomalies synaptiques et phénotypes cognitifs et comportementaux associés aux TSA. Par l'étude *post mortem* de tranches de cerveaux issues de patients souffrant de TSA, une augmentation de la densité en épines dendritiques des cellules pyramidales corticales a été constatée (Hutsler and Zhang, 2010) (Figure 32). L'ensemble de ces observations suggèrent une sur-connectivité neuronale, notamment des réseaux excitateurs, dans les TSA. Une étude utilisant de l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) a démontré une hyper-connectivité cérébrale fonctionnelle généralisée chez les enfants autistes. Ainsi, dès le plus jeune âge, le cerveau de personnes atteintes de TSA est hyperconnecté sur le plan fonctionnel. Ces travaux ont également révélé que les enfants rencontrant de plus grandes difficultés sociales présenteraient une plus grande connectivité cérébrale fonctionnelle (Supekar et al., 2013).

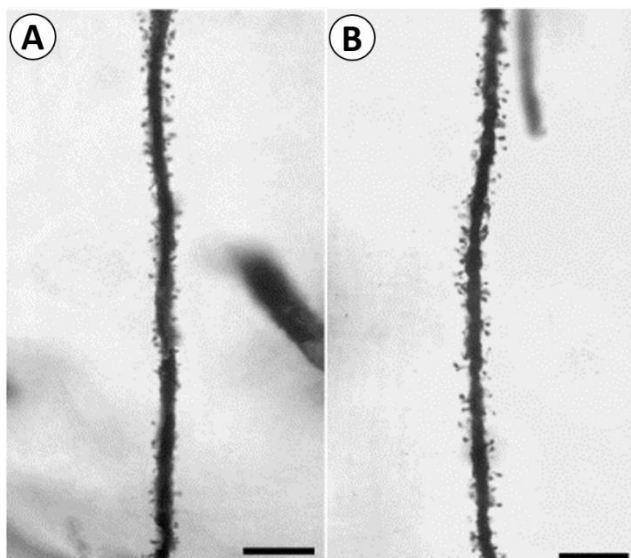


Figure 32. Segments de dendrites apicales imprégnés de Golgi provenant de neurones pyramidaux de la couche 5 du cortex frontal d'un patient contrôle (A) et d'un individu atteint d'un TSA (B). Echelle : 20 μ m
Source : Hutsler and Zhang (2010)

v. *Neuro-inflammation et atteinte microgliale*

Comme mentionné précédemment, des niveaux élevés de cytokines ont été mesurés dans le sérum provenant de patients présentant une **schizophrénie** (Miller et al., 2011 ; Potvin et al., 2008) et cette élévation a également été observée dans le liquide cérébro-spinal de certains patients (Garver et al., 2003). De la même manière, le cerveau de personnes atteintes de **TSA** présente une expression élevée d'IL-6 (Garbett et al., 2008 ; Vargas et al., 2005). Ainsi, l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires maintient un contexte d'inflammation dans le CNS des individus atteints de TSA ou de schizophrénie. Puisque les cellules microgliales produisent notamment, lorsque qu'activées, de l'IL-6 et du TNF- α , ces résultats pourrait suggérer des modifications de la réactivité microgliale. Cette hypothèse est soutenue par des études d'associations pangénomiques (GWAS) ayant fait le lien entre des variants génétiques du MHC et un risque accru de schizophrénie (Schizophrenia Psychiatric GWAS Consortium et al., 2011 ; Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014). De plus, des associations ont été établies entre TSA et variants génétiques du MHC (Needleman and McAllister, 2012).

L'utilisation de la minocycline, une tétracycline de seconde génération ayant des propriétés anti-inflammatoires et qui est un modulateur de l'activité microgliale (Cheng et al., 2015 ; Zhu et al., 2014), comme traitement pour des patients diagnostiqués schizophrènes, a révélé une amélioration de leurs symptômes négatifs et cognitifs (Levkovitz et al., 2010 ; Miyaoka et al., 2008), mais ces résultats n'ont pas été reproduits dans d'autres études. Il est important de noter que l'utilisation de minocycline pour le traitement de l'acné chez les adolescents confère une protection significative contre le risque de schizophrénie (Sellgren et al., 2019). Ainsi, les résultats hétérogènes sur l'effet de la minocycline dans le traitement de la schizophrénie pourrait, au moins en partie, s'expliquer par l'âge auquel le traitement est commencé : un âge de traitement précoce, ou un traitement au début de la pathologie, pourraient améliorer l'effet du traitement. L'utilisation de la minocycline dans le traitement des symptômes des TSA n'a pas permis de conclure à son efficacité (Pardo et al., 2013). Cependant, son utilisation sur des modèles génétiques de TSA a permis une réduction de certains comportements associés à l'autisme (Kumar and Sharma, 2016 ; Shigemori et al., 2015).

Par ailleurs, une étude sur tissus *post mortem* de patients **TSA** a révélé une augmentation de la densité des cellules microgliales et du volume de leur soma dans le PFC chez certains patients (9 sur 13) (Morgan et al., 2010). Une étude portant sur la densité des cellules

microgliales (positives pour Iba1) n'a pas révélé de changement significatif dans des cerveaux issus de patients schizophrènes par rapport au groupe témoin (Hercher et al., 2014). Cependant, une autre étude a montré que la densité de cellules microgliales exprimant le MHCII (*Major Histocompatibility Complex class 2*), un marqueur d'activation microgliale, est augmentée chez les patients schizophrènes (Fillman et al., 2013). Enfin, des études par PET scan utilisant des radio-ligands ciblant la TSPO (pour « *18kDa Translocator protein* ») ont permis de quantifier l'activation microgliale *in vivo* : l'expression de la TSPO est négligeable au sein du cerveau sain, mais est augmentée au sein des cellules microgliales « activées » (Ching et al., 2012). Chez les patients schizophrènes, malgré des résultats contradictoires liés en particulier à des différences méthodologiques dans l'analyse des données de PET-TSPO, la majeure partie des études récentes semblent converger vers l'observation d'une diminution du marquage TSPO dans le cerveau, qui pourrait refléter un profil de réactivité modifié des microglies (Meyer et al., 2020). Les divergences de résultats entre marqueurs histologiques et analyses *in vivo* en PET-Scan sont cependant difficiles à interpréter, car les analyses portent sur des patients à différents stades de la pathologie, qui n'ont pas été stratifiés selon leur profil inflammatoire. De plus, l'expression de TSPO n'est pas bien corrélée à des profils spécifiques de microglie (tel qu'établis, par exemple, par des analyses de RNA seq sur cellule unique).

Altérations	Schizophrénie	TSA
Système dopaminergique	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Voie mésolimbique</u> : hyperactivité D₂R • <u>Voie mésocorticale</u> : hypo-fonction D₁R 	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ de la dopamine dans le PFC • Altérations du système de la récompense : ↓ activation des aires fronto-striatales lors d'apprentissages sociaux
Système glutamatergique	<ul style="list-style-type: none"> • Hypo-fonction corticale associée à une hypo-fonction de la signalisation médiée par les NMDA_R 	<p><u>Deux théories :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • « <i>Hypoglutamate theory</i> » • « <i>Hyperglutamate theory</i> » <p>→ altération de la signalisation glutamatergique médiée par les NMDA_R</p>
Anomalies synaptiques	<ul style="list-style-type: none"> • Connectivité synaptique altérée : perte d'épines dendritiques et perte d'épaisseur du cortex 	<ul style="list-style-type: none"> • Altération de la balance excitation / inhibition • ↑ densité synaptique, notamment au sein du cortex, et hyper-connectivité fonctionnelle généralisée
Microglie	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ des cytokines circulantes (notamment IL-6) • Altérations des paramètres microgliaux (histologie, PET-TSPO) 	

Tableau 6. Résumés des principales altérations cérébrales associées aux cerveaux de patients atteints de schizophrénie ou de TSA.

L'ensemble de ces observations suggère qu'une convergence de facteurs environnementaux et génétiques pourraient induire une neuro-inflammation chronique mais de faible intensité prédisposant aux troubles neurodéveloppementaux dont la schizophrénie et les TSA. Les cellules microgliales sont centrales dans ce processus puisqu'elles sont les cellules de l'immunité au sein du SNC. Les progéniteurs microgliaux atteignent le cerveau dès 4.5 spf (Monier et al., 2007 ; Verney et al., 2010), et dans un contexte d'inflammation prénatale pourraient être « primées » / rendues « sensibles » lors du développement prénatal par l'intermédiaire de cytokines circulantes. Elles participeraient alors, par la suite, à l'établissement des altérations cérébrales associées.

La diversité des fonctions attribuées à la microglie au cours du développement, prénatal et postnatal, pourraient expliquer qu'une réactivité microgliale anormale soit déterminante dans la grande variété d'altérations observées dans le cerveau des patients schizophrènes ou atteints de TSA.

3. Génération et phénotypes des modèles animaux

Deux molécules, le **LPS** et du **Poly(I:C)** déjà évoquées plus haut, sont fréquemment utilisées pour induire une réponse inflammatoire dans des modèles murins d'activation immunitaire maternelle au cours de la gestation.

Le Poly(I:C) injecté à la femelle gestante, en particulier, engendre une réponse inflammatoire aiguë chez la mère qui se traduit par l'apparition de comportements dits de "maladie" (« *sickness behavior* »), incluant perte de poids, réduction de la prise alimentaire, augmentation des niveaux de cytokines. Plusieurs protocoles de MIA ont été utilisés, et varient selon le stade de développement auquel ils sont administrés, de la dose injectée à la femelle gestante et de la voie d'administration choisie, conduisant à un large spectre de phénotypes cognitifs et comportementaux chez les souris exposées (Figure 33). Les principaux protocoles de MIA induite par injection de Poly(I:C) et les phénotypes associés sont résumés dans le Tableau 7 ci-après.

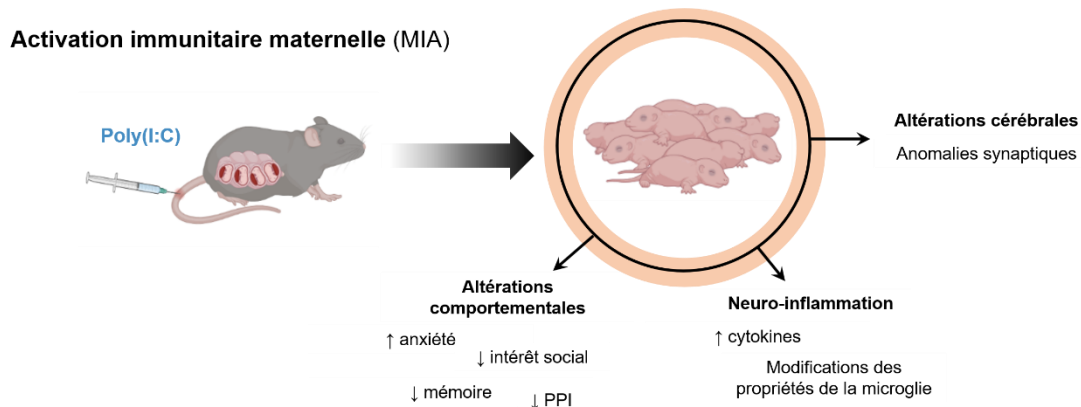


Figure 33. Dessin schématique de la modélisation d'une exposition prénatale à une MIA chez la souris et ses conséquences sur la cognition et le comportement des descendants exposés.

PPI : *pre-pulse inhibition*. Schéma créé à l'aide de BioRender.com

Parmi les altérations cérébrales retrouvées chez des modèles MIA, des études chez le rat ont révélé que l'exposition prénatale à une inflammation maternelle entraîne des défauts de l'activité *in vivo* des **neurones DA de la VTA** (De Felice et al., 2019 ; Lecca et al., 2019 ; Luchicchi et al., 2016). Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents ne sont pas détaillés. Par ailleurs, des **anomalies synaptiques** ainsi que des modifications de la **microglie** sont observées dans le cortex et l'hippocampe de souris descendantes de mères exposées au Poly(I:C) pendant la gestation (Tableau 7).

Animaux	Injection de Poly(I:C)			Altérations (observées chez les animaux exposés à la MIA)		Références
	Jour	Dose	Route	Physiologiques	Comportementales	
Souris	E9 – E9.5	5 mg/kg	IV	<ul style="list-style-type: none"> Chez les mâles : ↑ de certaines cytokines dont IL-1β dans l’HPC ; pas de changement pour IL-6 et TNFα Pas de changement du nombre de cellules Iba1+, ni de leur morphologie, ni du nombre de cellules CD68+ dans l’HPC chez la jeune souris et la souris adulte ↑ volume des ventricules cérébraux 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ sensorimotor gating (<i>pre-pulse inhibition test</i>) ↑ réponse locomotrice aux amphétamines, et à la kétamine ↑ anxiété (open field) Déficit de la mémoire de travail (T-maze) 	(Abazyan et al., 2010 ; Giovanoli et al., 2016 ; da Silveira et al., 2017 ; Li et al., 2009 ; Vuillermot et al., 2010 ; Meyer et al. 2008)
			IP	<ul style="list-style-type: none"> ↑ des niveaux d’expression du TLR3 et des iNOS + ↑ ARNm TNFα et IL-6 dans le cortex frontal de jeunes adultes exposés à une MIA 	<ul style="list-style-type: none"> Altération de la mémoire de travail (T-maze) 	(MacDowell et al., 2017)
		2.5/5/10 mg/kg	IV	<ul style="list-style-type: none"> ↑ de certaines cytokines dans le sérum maternel et cerveau fœtal après injection 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ anxiété (open field) Altération de la mémoire de travail 	(Meyer et al., 2006, 2005)

					<ul style="list-style-type: none"> • ↓ <i>pre-pulse inhibition</i> 	
		20 mg/kg	IP	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ du nombre de microglie dans le striatum et l'HPC ; pas de changement dans le cortex • ↓ de l'expression de CD11b chez la souris adulte • ↑ nombre de cellules Iba1+, et ↑ de cellules amiboïdes 	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ <i>pre-pulse inhibition</i> 	(Juckel et al., 2011 ; Manitz et al., 2016 ; Shi et al., 2003 ; Zhu et al., 2014)
	E12 – E12.5	20 mg/kg	IP	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ production de TNFα par des explants issus de cerveaux de nouveaux-nés exposés à une MIA • ↑ ARNm IL-6 par les microglies CD11b+ à E16.5 • ↓ significative de la densité d'épines dendritiques dans le cortex <i>in vivo</i> (PFC) chez la jeune souris • Altération de la morphologie et de la dynamique des épines dendritiques du cortex • ↓ fréquence des mEPSCs sans 	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ anxiété (<i>Elevated Plus Maze paradigm</i>) • ↓ intérêt social ; ↓ social préférence • ↑ compulsivité (<i>marble burying test</i>) • ↓ <i>pre-pulse inhibition</i> 	(Choi et al., 2016 ; Coiro et al., 2015 ; Garcia-Valtanen et al., 2020, 2020 ; Hsiao and Patterson, 2012 ; Onore et al., 2014 ; Pratt et al., 2013 ; Shi et al., 2009 ; Xuan and Hampson, 2014)

				changement de leur amplitude ; = fréquence des mIPSCs, mais ↓ de leur amplitude (PFC)		
	E13-15	5 mg/kg	IV	<ul style="list-style-type: none"> Pas de changement de la densité des cellules Iba1+ 		(Paylor et al., 2016)
		20 mg/kg	IP		<ul style="list-style-type: none"> ↓ préférence sociale 	(Aavani et al., 2015)
	E17 – E17.5	4 mg/kg	IV		<ul style="list-style-type: none"> Altération de la mémoire de travail ↑ de la réponse locomotrice aux amphétamines 	(Meyer et al., 2008a)
		5 mg/kg	IV	<ul style="list-style-type: none"> Pas de modification du volume des ventricules cérébraux ↓ DA dans le PFC médian et l’HPC ventral ↓ niveaux de glutamate dans le PFC (chez les mâles) et dans l’HPC dorsal ↓ niveaux de GABA dans l’HPC dorsal (chez les femelles) 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ anxiété ↑ de la réponse locomotrice à la kétamine ↓ préférence pour le sucrose = anhédonie ↓ préférence sociale Altération de la mémoire de travail (<i>T-maze</i>) Pas d’altération de la <i>pre-pulse inhibition</i> 	(Bitanhirwe et al., 2010 ; Connor et al., 2012 ; da Silveira et al., 2017 ; Li et al., 2009)
Rat	E9	10 mg/kg	IV	<ul style="list-style-type: none"> Augmentation des niveaux de cytokines dans le 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ performant au test de <i>pre-pulse inhibition</i> 	(Ding et al., 2019)

				<p>PFC et l'HPC chez les animaux exposés à la MIA</p> <ul style="list-style-type: none"> • Altérations de la glie ; notamment ↑ densité microgliale dans le PFC et l'HPC chez l'adulte 		
	E15	4 mg/kg	IV	<ul style="list-style-type: none"> • Chez les mâles : ↑ de certaines cytokines dont IL-1β et TNFα ; pas de changement pour IL-6 • ↑ dopamine dans le NAcc • ↓ du nombre de cellules DA qui déchargent au sein de la VTA ↓ de leur taux de décharge (notamment en bursts) chez l'adulte <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Pas d'effet sur le <i>pre-pulse inhibition test</i> <u>ou</u> ↓ • ↓ préférence pour la nouveauté • Altération de la mémoire de reconnaissance d'objets (NOR) • Défaut de la mémoire de travail (Odor Span Test) • ↓ interaction sociale 	<p>(Ballendine et al., 2015 ; De Felice et al., 2019 ; Howland et al., 2012 ; Lecca et al., 2019 ; Luchicchi et al., 2016 ; Murray et al., 2017 ; Van den Eynde et al., 2014 ; Vernon et al., 2015 ; Wolff et al., 2011 ; Wolff and Bilkey, 2010, 2008)</p>
	E19	4 mg/kg	IV	<ul style="list-style-type: none"> • Chez les mâles : ↑ significative de l'expression du gène C4 dans le cortex cingulaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Altération de la mémoire de travail 	<p>(Duchatel et al., 2018 ; Meehan et al., 2017)</p>

Tableau 7. Principales altérations physiologiques et comportementales retrouvées chez les modèles MIA obtenus par l'injection de Poly(I:C) à la femelle gestante, dépendamment du stade embryonnaire, de la dose et de la voie d'injection.

En conclusion, les modèles animaux de **MIA** permettent l'étude des conséquences de l'exposition à une inflammation prénatale, un facteur de risque associé à certains troubles neuropsychiatriques comme les TSA et la schizophrénie, sur le développement cérébral. Les altérations du système DA sont au cœur de la pathophysiologie associée à ces troubles neurodéveloppementaux. Plusieurs études ont révélé que, chez des modèles MIA, l'exposition prénatale à une MIA altère l'activité des neurones DA de la **VTA** *in vivo* (Tableau 7). Cependant, les mécanismes expliquant la manière dont la MIA entraîne de tels effets à long-terme ne sont pas compris.

Objectifs de la thèse

La modélisation chez le rongeur d'une exposition *in utero* à une MIA, un facteur de risque associé à certains désordres neuropsychiatriques comme les TSA et la schizophrénie, permet l'étude des conséquences d'une inflammation prénatale sur le développement cérébral. Des études conduites chez le rat ont montré que l'exposition *in utero* au Poly(I:C) a pour conséquence une réduction de l'activité *in vivo* des neurones DA de la VTA. Cependant, les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués restent inconnus. De manière plus générale, les effets à long terme d'une inflammation chez la mère gestante sur la physiologie neuronale *in vivo* chez la descendance et les processus sous-jacents sont peu étudiés.

Après avoir confirmé que les effets observés sur la décharge des neurones DA *in vivo* chez le rat sont aussi présents dans un modèle murin de MIA, nous avons étudié les effets de la MIA sur les propriétés physiologiques des neurones DA de la VTA *ex vivo*. Les altérations de l'excitabilité observées dans le groupe MIA ne pouvaient expliquer la diminution globale de la décharge constatée *in vivo*. En revanche, la perte spécifique d'entrées synaptiques excitatrices et les changements de leurs propriétés fonctionnelles que nous avons observés dans les neurones DA des souris MIA semblaient compatibles avec les changements à long terme de la décharge des neurones *in vivo*. Etant donné que la microglie intervient dans le raffinement des connections synaptiques dépendant du système du complément, nous avons fait l'hypothèse que des changements des propriétés microgliales induits par la MIA sont impliqués dans la perte de synapses glutamatergiques et ainsi, *in fine*, causent les altérations de la décharge *in vivo*. Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié la densité, les propriétés morphologiques et de phagocytose de la microglie dans la VTA des souris descendantes de mères exposées au Poly(I:C) pendant la gestation. Nous avons aussi administré de la minocycline aux souris MIA pendant la période néonatale de manière à moduler la réactivité de la microglie pendant la période critique du raffinement synaptique et ainsi tester le rôle fonctionnel de la microglie dans les phénotypes observés.

Ainsi ce projet de thèse a pour but de tester l'hypothèse selon laquelle l'exposition prénatale à une MIA, par le biais de la microglie et de l'élagage synaptique dépendant du complément, interfère avec la connectivité des cellules DA de la VTA, entraînant finalement des altérations de l'activité des neurones DA à l'âge adulte.

Résultats

Article. L'activation immunitaire prénatale, via la microglie, altère la connectivité et l'activité *in vivo* des neurones dopaminergiques de la VTA

Cette étude a pour but de tester notre hypothèse selon laquelle l'exposition prénatale à une MIA, par le biais de la microglie et de l'élagage synaptique dépendant du complément, interfère avec la connectivité des cellules DA de la VTA, entraînant finalement des altérations de l'activité et du mode de décharge *in vivo* des neurones DA à l'âge adulte.

Nous avons ainsi étudié :

- Les conséquences d'une exposition prénatale au Poly(I:C) sur l'activité *in vivo* des neurones DA de la VTA, ainsi que sur leurs propriétés intrinsèques et leur connectivité synaptique *ex vivo*;
- Les conséquences d'une exposition prénatale au Poly(I:C) sur la densité, la morphologie et la fonction des cellules microgliales de la VTA ainsi que sur l'expression dans le mésencéphale de C1q, la protéine initiatrice de la cascade du complément ;
- Si un traitement post-natal à la minocycline, une tétracycline capable d'altérer la réactivité microgliale, bloque les effets de l'exposition prénatale à une MIA sur l'activité *in vivo* et la connectivité des neurones DA de la VTA

Méthodes utilisées

Pour cette étude, nous avons induit la MIA par une injection intraveineuse de Poly(I:C) (5mg/kg) au jour embryonnaire 9 (E9) chez la femelle gestante. Le poids des femelles injectées est suivi 6h, 24h et 48h après l'injection. L'efficacité de la MIA a été systématiquement vérifiée par la perte de poids significative (> 3%) 24h après l'injection de Poly(I:C) à la femelle gestante.

Afin d'étudier les effets de l'exposition prénatale à une inflammation maternelle sur l'activité *in vivo* des neurones DA, nous avons effectué des enregistrements juxtacellulaires des cellules DA de la VTA chez des souris adultes contrôles et exposées *in utero* à la MIA, dans le cadre d'une collaboration avec Fabio Marti et Tinaïg Le Borgne (équipe « Neurophysiologie et Comportement (NPC) », à l'ESPCI).

Pour identifier les neurones DA dans des tranches de cerveau *ex vivo*, nous avons tiré parti de l'expression de la eGFP (« *enhanced Green-Fluorescent Protein* ») au sein des neurones DA de la VTA dans le modèle murin *Drd2-EGFP-L10a*. Grâce à des techniques

d'électrophysiologie (whole-cell patch-clamp) et d'immunohistochimie sur des tranches de cerveau de souris âgées de 25 à 30 jours, nous avons poursuivi la caractérisation des effets de l'exposition à une MIA sur les propriétés intrinsèques et la connectivité des neurones DA de la VTA.

Nous avons ensuite étudié la morphologie des cellules microgliales de la VTA, ainsi que le volume des structures lysosomales CD68+ et d'éléments présynaptiques Bassoon+ qu'elles contiennent.

Enfin, nous avons testé si un traitement à la minocycline durant les deux premières semaines de vie post-natale normalise certains effets de l'exposition prénatale à une MIA sur la physiologie des neurones DA de la VTA.

Résultats principaux

L'exposition prénatale à une MIA à E9 induit des conséquences durables sur l'activité et la connectivité des neurones DA de la VTA ainsi que sur la microglie.

Nous avons notamment pu observer :

- Une diminution globale de la fréquence de décharge *in vivo* des neurones DA de la VTA, qui de plus sont moins susceptibles de décharger en bursts ;
- Une perte de synapses excitatrices et une hypofonction des NMDA_R dans les neurones DA de la VTA, en l'absence de changements détectables aux synapses inhibitrices ;
- Des changements de la morphologie microgliale et de la phagocytose d'éléments synaptiques par la microglie au sein de la VTA ;
- Que l'administration de minocycline chez les nouveaux-nés issus de mère exposées au Poly(I:C) par l'intermédiaire du lait maternel normalise l'activité *in vivo* des neurones DA de la VTA ainsi que leurs entrées synaptiques excitatrices *ex vivo*.

Maternal immune activation disrupts the activity and connectivity of dopaminergic neurons through alterations of synaptic refinement by microglia

Célia Delhay^{1,2,3}, Fabio Marti^{4,5,6}, Emilie Turlure^{1,2,3}, Tinaïg Le Borgne^{4,5,6}, Philippe Faure^{4,5,6} and Corentin Le Magueresse^{1,2,3#}

¹ INSERM UMR-S 1270, 75005, Paris, France

² Sorbonne Université, 75005, Paris, France

³ Institut du Fer à Moulin, 17 rue du Fer à Moulin 75005, Paris, France

⁴ CNRS UMR 8249, 75005, Paris, France

⁵ Université Paris Sciences et Lettres, 75005, Paris, France

⁶ ESPCI, 10 rue Vauquelin, 75005, Paris, France

Correspondence: corentin.le-magueresse@inserm.fr

Abstract

Maternal immune activation (MIA) is associated with an increased risk of neurodevelopmental disorders. Rodents born to mothers exposed during gestation to Poly(I:C), a synthetic RNA mimicking a viral infection, show disruptions of dopaminergic (DA) circuits, which are critically impaired in psychiatric disorders. How MIA leads to alterations in DA neuron function is poorly understood. Here, we investigated the mechanisms by which Poly(I:C)-induced MIA causes persistent changes in the activity of ventral tegmental area (VTA) DA neurons. We found decreased action potential frequency and decreased burst firing of VTA DA neurons in adult MIA offspring *in vivo*. MIA offspring displayed decreased excitatory synaptic transmission and dendritic spine density, but unchanged inhibitory synaptic inputs, suggesting that impaired excitatory/inhibitory balance may contribute to alter DA neuron firing *in vivo*. Notably, our results show specifically decreased NMDA receptor function, a major driver of burst firing in DA neurons, in MIA offspring. We also observed decreased intrinsic excitability and increased HCN-mediated I_h currents in VTA DA neurons from MIA offspring, which likely reflects homeostatic compensations. Furthermore, MIA

increased phagocytosis of synaptic material by microglial cells in the VTA, and caused elevated expression of C1q, a complement molecule implicated in synapse pruning by microglial cells. Finally, neonatal administration of minocycline, a brain-permeant tetracycline that alters microglial reactivity, rescued the firing activity of DA neurons *in vivo* and normalized excitatory inputs to VTA DA neurons *ex vivo*. These results suggest that MIA may lead to a long-lasting impairment of DA neuron firing by affecting complement- and microglia-dependent synaptic refinement of excitatory inputs during postnatal development of the VTA.

Introduction

Inflammatory challenges during pregnancy, caused by infections but also non-infectious stimuli such as stress, are associated with increased neuropsychiatric disorders in the offspring, such as Autism Spectrum Disorder (ASD) and schizophrenia¹.

Animal models have been widely used to study how maternal immune activation (MIA) disrupts normal brain development. One of the most widely used agents to model MIA is polyinosinic-polycytidylic acid (Poly(I:C)), a double-stranded synthetic RNA which can be injected to pregnant dams to mimic a viral infection. *In utero* exposure to Poly(I:C) results in behavioral abnormalities in the offspring that are reminiscent of ASD and schizophrenia-associated phenotypes, including deficits in social interaction², sensorimotor gating³, latent inhibition^{3,4}, and repetitive behaviors². These phenotypic aberrations are thought to result from an abnormal development trajectory that impacts neuronal connectivity and neurotransmission⁵. Indeed, alterations in synapse number and function have been identified in the brain of MIA offspring. At neocortical and hippocampal excitatory synapses, these changes include decreased relative NMDA receptor (NMDA_R) contribution to synaptic currents⁶, decreased frequency of spontaneous synaptic currents⁷, lower glutamatergic synapse density⁸ and decreased dendritic spine turnover *in vivo*⁹. MIA was also found to cause deficits in inhibitory synaptic transmission in the offspring's cortex. Thus, the frequency of spontaneous inhibitory synaptic currents is decreased in the cortex mice born to Poly(I:C)-exposed mothers, which can be at least partly attributed to a diminished probability of GABA release from parvalbumin-expressing interneurons¹⁰.

Microglial cells are the resident macrophages in the central nervous system and are key mediators of complement-dependent synaptic refinement during postnatal brain maturation^{11,12}. *Post-mortem* studies in patients with ASD and schizophrenia revealed persistent neuroinflammation¹³ and microglial impairments^{14,15}. MIA models consistently reproduced some of these phenotypes^{6,9,16,17}. Moreover, treatment with minocycline, a brain-penetrant tetracycline antibiotics which alters microglial reactivity^{18,19} and inhibits synapses engulfment *in vitro*²⁰ has shown beneficial effects for the treatment of positive and negative symptoms in schizophrenia²¹, a disease long suspected to result from deficits in the mechanisms of synaptic pruning²² and consistently associated with decreased synapse density in the cortex of schizophrenic patients²³⁻²⁵. Furthermore, minocycline reduces schizophrenia risk when administered in adolescence to treat acne²⁰. Based on these observations, it has been

proposed that MIA may lead to persistent changes in microglia reactivity and ultimately result in aberrant synaptic refinement and pathological disruption of neurotransmission²⁶.

Mesolimbic and mesocortical dopaminergic (DA) pathways are critically involved in reward, motivation, cognition, and aversion^{27,28}. Pathological alterations of DA neurotransmission are hallmarks of ASD²⁹ and schizophrenia³⁰. Remarkably, prenatal exposure to MIA in rats lowers the firing rate and alters the burst firing pattern of DA neurons *in vivo* in the ventral tegmental area (VTA), the major source of DA neurons of the mesolimbic and mesocortical pathways^{31,32}. However, the underlying mechanisms are unclear. More generally, there is scant knowledge on how MIA leads to long-term changes in neuronal activity *in vivo*.

Here, we hypothesized that prenatal exposure to MIA, through microglial activation and complement-dependent synaptic pruning, interferes with VTA DA neuron connectivity, ultimately leading to alterations of DA neuronal activity in adulthood. Using *in vivo* and *ex vivo* electrophysiological recordings, we first studied the effects of prenatal MIA exposure on DA neurons firing rate and intrinsic properties. In a next step, we investigated how *in utero* MIA exposure affects the connectivity and synaptic properties of VTA DA neurons, and changes the properties and phagocytic activity of microglial cells in juvenile animals. Finally, we sought to demonstrate the causal role of microglia reactivity in MIA-elicited changes in VTA DA neurons, using administration of minocycline in neonates.

Materials and methods

Animals

All animal experiments were carried out according to European Community guidelines for the use of animals in research and were approved by the local ethical committees. For *ex vivo* electrophysiology and immunohistochemistry experiments, heterozygous *Drd2-EGF-L10a* males on a C57Bl/6J background (kindly provided by Dr Jean Antoine Girault and Dr Denis Hervé, Institut du Fer à Moulin, Paris, France) expressing eGFP under the dopamine receptor 2 (D₂R) promoter were mated to wild-type C57Bl6/J females (Janvier Labs). C57Bl6/J mice were used for *in vivo* electrophysiology experiments. Mice were housed under specific pathogen-free (SPF) conditions in individual ventilated cages and isolators, with *ad libitum* access to food and water, living under 12:12 hours light/dark cycles. Temperature was maintained at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and relative humidity was kept between 30% and 60%.

Maternal immune activation (MIA)

Successful mating was verified by the presence of a vaginal plug and this day was referred to as embryonic day 0.5 (E0.5). At embryonic stage E9, pregnant mice were randomly assigned to a single injection of endotoxin-free 0.9% NaCl (Braun) solution (control condition) or single injection of Poly(I:C) (polyinosinic–polycytidylic acid sodium salt; #P1530, Sigma-Aldrich) at a concentration of 5 mg/kg. All solutions were injected using an injection volume of 5 mL/kg. The injections were performed in the tail vein under mild physical constraint. Females were immediately returned to their home cage. The offspring of Poly(I:C)- or saline-injected dams were weaned on postnatal day 30 (P30). Same-sex littermates were housed in separate cages in groups of 3 to 5 animals per cage.

Minocycline treatment

Minocycline was administered to MIA and control neonates aged P1 to P15 by adding it to the drinking water of the dam at a daily dosage of 50 mg/kg of body weight. Minocycline was dissolved in the drinking water and given as a unique source of water to the nursing females, which passed it to their offspring via lactation³³. To cover the bitter taste of minocycline, water was supplemented with 5% sucrose³³. The bottles containing the drinking water supplemented with minocycline + sucrose were protected from light. The addition of minocycline to the mother's drinking water has been shown to yield detectable levels of the drug in the breast milk

of the nursing mother³⁴. The oral administration route was chosen to avoid stressful daily injections to the newborns.

***In vivo* juxtacellular recordings**

Adult male mice (8-12 weeks) were anesthetized with isoflurane 2% and positioned in a stereotaxic frame. A hole was drilled in the skull above midbrain DA nuclei (coordinates: 5 ± 1.5 mm posterior to bregma, 1 ± 1 mm [VTA] lateral to the midline³⁵). Recording electrodes were pulled from borosilicate glass capillaries (with outer and inner diameters of 1.50 and 1.17 mm, respectively) with a Narishige electrode puller. The tips were broken under microscope control and filled with 0.5% sodium acetate. Electrodes had tip diameters of 1-2 μm and impedances of 5-10 $\text{M}\Omega$. A reference electrode was placed in the subcutaneous tissue. The recording electrodes were lowered vertically through the hole with a micro drive. Electrical signals were amplified by a high-impedance amplifier Axoclamp2A. The unit activity was digitized at 12.5 kHz and stored in Spike2 program. The electrophysiological characteristics of DA neurons were analyzed in the active cells encountered when systematically passing the microelectrode in a stereotaxically defined block of brain tissue including the VTA³⁵. Its margins ranged from -4.9 to -5.9 mm posterior to bregma (AP), 0.5 to 1 mm mediolateral (ML) and 7 to 8.5 mm ventral (DV). Sampling was initiated on the right side and then on the left side. Extracellular identification of DA neurons was based on their location as well as on the set of unique electrophysiological properties that distinguish DA from non-DA neurons *in vivo*: (i) a typical triphasic action potential with a marked negative deflection; (ii) a long duration (>2.0 ms); (iii) an action potential width from start to negative trough > 1.1 ms; (iv) a slow firing rate (<10 Hz and >1 Hz). Electrophysiological recordings were analyzed using the R software (<https://www.r-project.org>). DA cell firing was analyzed with respect to the average firing rate and the percentage of spikes within bursts (%SWB, number of spikes within burst divided by total number of spikes). Bursts were identified as discrete events consisting of a sequence of spikes such that: their onset is defined by two consecutive spikes within an interval <80 ms whenever and they terminate with an inter-spike interval >160 ms. Firing rate and %SWB were measured on successive windows of 60 s, with a 45 s overlapping period on a total period of 300 s.

Acute slice preparation

Twenty-five to thirty day-old (P25 – P30) mice were deeply sedated (pentobarbital, 140mg/kg, i.p.) and the brain was quickly removed from the skull. 220 μm -thick horizontal brain slices

were prepared from control and Poly(I:C)-exposed heterozygous *Drd2-EGF-L10a* mice, using a vibroslicer (HM 650 V, Microm). Slices were cut in ice-cold (0–4°C) oxygenated (95% O₂-5% CO₂) solution containing 110 mM choline chloride, 2.5 mM KCl, 25 mM glucose, 25 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 0.5 mM CaCl₂, 7 mM MgCl₂, 11.6 mM L-ascorbic acid, and 3.1 mM sodium pyruvate. Slices were then stored in artificial cerebro-spinal fluid (aCSF) containing 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 25 mM glucose, 25 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, and 1 mM MgCl₂ (pH 7.2, maintained by continuous bubbling with 95% O₂-5% CO₂). Slices were incubated in aCSF at 32°C for 20 min and then at room temperature (20–25°C).

***Ex vivo* patch-clamp**

Slices were transferred to the recording chamber where they were continuously superfused with oxygenated aCSF (30–32°C). VTA D₂R-expressing neurons were identified under an upright microscope (Olympus BX51WI) thanks to their eGFP expression and recorded using whole-cell patch-clamp. Current clamp and voltage clamp recordings were performed with pipettes (5 to 7 MΩ resistance) prepared from borosilicate glass (BF150-86-10; Harvard Apparatus) using a DMZ pipette puller (Zeitz). For current-clamp experiments, pipettes were filled with an intracellular solution containing 105 mM K-gluconate, 10 mM HEPES, 10 mM phosphocreatine-Na, 4 mM ATP-Na₂, and 30 mM KCl (pH 7.25, adjusted with KOH). For voltage clamp recordings, we used an intracellular solution containing 120mM methane sulfonate, 10mM CsCl, 10mM Hepes, 10mM Phosphocreatine, 0.2mM EGTA, 8mM NaCl, 2mM ATP-Mg, 3mM QX 314 (pH 7.25, adjusted with CsOH). For miniature inhibitory postsynaptic currents recordings, we used the following intracellular solution: 60mM Cs methane sulfonate, 70mM CsCl, 10mM Hepes, 10mM Phosphocreatine, 0.2mM EGTA, 8mM NaCl, 2mM ATP-Mg (pH 7.25, adjusted with CsOH). Current-clamp and voltage-clamp recordings were performed using an EPC-10 amplifier (HEKA Elektronik). Data acquisition was performed using Patchmaster software (Heka Elektronik). The liquid junction potentials (–14.9 mV for cesium-based intracellular solutions and -5 mV for the potassium-based intracellular solution) were left uncorrected. Signals were low pass-filtered at 4 kHz and sampled at 20 kHz. Data analysis was performed using Clampfit (Molecular Devices) and Igor Pro (WaveMetrics Igor Pro).

Intrinsic cellular properties, excitability, sag potential and I_h current

The input resistance and the membrane capacitance were computed using a 10mV hyperpolarizing step from a holding potential of -65 mV (50 ms). The intrinsic passive and active properties of eGFP-expressing neurons were measured in the presence of 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX; $10\mu\text{M}$, Hello Bio), D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-APV; $50\mu\text{M}$, Hello Bio) and SR95531 hydrobromide (GABAzine; $10\mu\text{M}$, Hello Bio) in the aCSF to block synaptic transmission. Frequency-current (F-I) curves were obtained using sequential 500-ms injections of depolarizing currents in steps of 50 pA. Sag potentials were recorded using -150 , -100 and -50 pA current steps from a holding potential of -65 mV (500 ms duration). The *sag* was measured as the amplitude between the peak voltage induced by the hyperpolarizing current and the steady state voltage measured at the end of the current injection step. I_h currents were studied in voltage clamp using hyperpolarizing 1-s step voltage pulses from -50 mV to -100 mV in 10 mV increments.

Miniature post-synaptic currents

Miniature excitatory and inhibitory post-synaptic currents (mEPSCs and mIPSCs) in eGFP-positive cells were recorded at holding potential of -65 mV. Tetrodotoxin (TTX; $0.5\mu\text{M}$, Hello Bio) was added to the aCSF to block action potential – dependent synaptic transmission. For mEPSCs recordings, GABAzine ($10\mu\text{M}$) was added to the aCSF. mIPSCs recordings were performed in presence of CNQX ($10\mu\text{M}$) and D-APV ($50\mu\text{M}$). Miniature post-synaptic currents recordings were filtered offline at 2 kHz and at least 100 s of each recording were analyzed using MiniAnalysis software (Synaptosoft).

Paired-pulse ratio

In order to calculate the paired-pulse ratio, fifteen sweeps of two consecutive (25, 50 or 100 ms intervals) evoked excitatory post-synaptic currents (eEPSCs) were recorded at a holding potential of -65 mV in presence of GABAzine ($10\mu\text{M}$). Currents were evoked using a monopolar electrode connected to a constant current stimulator (Iso-Flex, A.M.P.I.) and positioned in the surrounding area of the recorded neuron at a distance of approximately 100 μm from the soma. The paired-pulse ratio was computed as the ratio of the mean peak amplitude of the current evoked by the second stimulation to the mean peak amplitude of the current evoked by the first stimulation.

AMPA/NMDA ratio

To assess the AMPA/NMDA ratio in D₂R-expressing neurons, evoked excitatory post-synaptic currents (eEPSCs) were evoked with a monopolar electrode connected to a constant current stimulator and positioned 100-150 μ m away from the eGFP-expressing recorded neuron, in the presence of GABA_Azine (10 μ M). At least 12 consecutive sweeps were acquired and averaged at each holding potential. The AMPA current (I_{AMPA}) was measured as the peak amplitude of the current response at a holding potential of -65mV. The NMDA current (I_{NMDA}) was measured at a holding potential of +55mV, 50 ms after stimulation, when the AMPA_R-mediated current has receded due to the fast deactivation kinetics of AMPA_R. The ratio was calculated as $I_{\text{AMPA}}/I_{\text{NMDA}}$.

Immunohistochemistry

While deeply sedated (pentobarbital, 140 mg/kg, i.p.), mice were transcardially perfused with 4% buffered formaldehyde (Histofix, Roti®). The brains were removed and post-fixed in 4% Histofix overnight at 4°C. The next day, the brains were transferred into phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.01% sodium azide at 4°C, until sliced. 50 μ m-thick coronal sections were cut using a vibratome (VT1000S, Leica). Four to eight VTA-containing brain slices were selected and washed twice for 10 min in PBS. Free-floating sections were permeabilized and saturated with a solution of PBS containing 0.2% Triton (except for Bassoon immunohistochemistry in which we used 0.5%) and 3% bovine-albumine serum (BSA) for 1 hour. Samples were incubated under gentle agitation at 4°C for 48 hours with primary antibodies diluted in the permeabilizing and saturating solution (0.2% Triton (except for anti-Bassoon immunohistochemistry in which we used 0.5%) and 3% BSA in PBS). After two nights, brain slices were washed three times for 15 min in PBS. Secondary antibodies were incubated in 3% BSA-containing PBS for 2 hours at room temperature, in the dark, under gentle agitation. After three washing steps in PBS, samples were mounted on slides in Fluoromount G (Fluoromount GTM Mounting Medium, Invitrogen). Primary antibodies were: chicken anti-Tyrosine Hydroxylase (TH; 1:1000, Millipore), rabbit anti-GFP (1:500, Molecular Probes), rabbit anti-Iba1 (1:500, Wako), rabbit anti-Iba1 (1:400, Synaptic Systems), rat anti-CD68 (1:1000, Bio-Rad), mouse anti-bassoon (1:500, Santa Cruz). Secondary antibodies were: goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:1000, Life Technologies), goat anti-rat Cy3 (1:1000, Life Technologies), goat anti-chicken Alexa Fluor 647 (1:1000, Jackson ImmunoResearch), goat anti-mouse Alexa Fluor 647 (1:1000, Life Technologies).

Biocytin cell filling and subsequent histological processing

To image dendritic spines, patch-clamp pipettes were filled with an intracellular solution supplemented with biocytin (HelloBio). Brain slices containing the biocytin-filled cells were incubated in 4% Histofix at 4°C. 48 hours later, slices were transferred into PBS, and stored at 4°C. Slices were rewashed three times for 5 minutes in PBS and quenched in 1% H₂O₂ for 5 minutes, then washed again four times in PBS. The sections were then permeabilized in 2% Triton in PBS for 1 hour, and incubated with Cy3-conjugated Streptavidin (1:1000, Invitrogen) in PBS overnight at 4°C, under gentle agitation in the dark. The following day, the slices were washed three times in PBS and mounted on a coverslip in Fluoromount G mounting medium, using spacers (IS010, iSpacer®, SunJin Lab).

Image acquisition and analysis

Quantification of TH and GFP expression

To quantify the percentage of dopaminergic (TH+) GFP+ cells, and the percentage of GFP+ cells that are dopaminergic (TH+), we acquired images in the VTA of 30 days-old mice thanks to an upright confocal microscope (SP5, Leica), using a 40x oil objective. Cells were identified and counted using the Cell counter plugin for ImageJ.

Iba1+ cell density

To quantify the Iba1+ microglial cells density in the VTA of 15-18 days-old mice, images were acquired using an epifluorescence microscope (DM6000, Leica). Quantifications were based on images obtained from a coronal VTA slice from the two brain hemispheres of each mouse. The average value was established from these two slices for each animal. Iba1+ cells were identified and counted using the Cell counter plugin for ImageJ.

Microglial cells reconstruction

For 3D reconstructions, all images were acquired using an upright confocal microscope (SP5, Leica) and a 40x oil objective with 3X electronic magnification. Stacks were acquired with a 0.5 μm z-step interval. ImageJ was used to process the images stacks as previously described³⁶. Microglia 3D reconstructions were performed using the IMARIS software. To reconstruct the total volume and the soma of microglia, CD68-labeled lysosomes and Bassoon-positive synaptic material, the surface module of IMARIS was used, as previously described^{36,37}. Using the filament tracer module, the morphology of microglia was reconstructed and the total length

of microglial processes was measured. 3D-Sholl analysis was performed to assess morphological parameters³⁷. To evaluate the total volume and soma volume of microglia, the percentage of CD68 volume in Iba1-positive cells volume, the total length of microglial processes and perform the 3D-sholl analysis, we reconstructed 11 to 23 cells per mouse, in 11 controls and 8 MIA-exposed mice for a total of 324 reconstructed microglia. To quantify the volume of Bassoon-positive material within Iba1-positive cells, we reconstructed 10 to 13 cells per mouse, in 11 controls and 9 MIA offspring for a total of 227 reconstructed microglia.

Spine density measurements

To assess dendritic spine density, primary dendrites from biocytin-filled neurons were imaged with an upright confocal microscope (SP5, Leica) using a 63x-oil objective and a 2.5X electronic magnification. Stacks were acquired with a 0.3 μm z-step interval. Z-stack images were process in ImageJ and the total length of the imaged dendritic segment was measured. Spines were counted using the Cell counter plugin.

Immunoblotting

To quantify C1q protein expression in the midbrain, P30-old control and MIA offspring were deeply anesthetized (pentobarbital, 140 mg/kg, i.p.). Their brains were extracted and snap frozen in liquid nitrogen. 210 μm coronal slices were cut using a cryostat (Leica). Using sample corers, tissue punches (diameter: 1mm) were taken from the midbrain region. All tissue samples were stored at -80°C for further extraction. Samples were homogenized in 1% SDS solution, sonicated and boiled for 5 min at 100°C. Protein concentrations were determined using a BCA kit (Thermo Scientific). 30 μg of proteins per sample were mixed in 2x Laemmli Buffer, then separated by electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes. After blocking in 3% BSA in TBS with 0.1% Tween-20 (TBS-T) for 1 hour at room temperature (RT) followed by washes with TBS-T, membranes were incubated with the primary antibodies (anti-actin: 15 min at RT; anti-C1q: overnight at 4°C; anti-TH: 1.5 hours à RT). After further washing, the membranes were finally incubated for 2 hours at RT with the secondary antibodies and then imaged with Odyssey CLx (LI-COR). Protein bands were quantified using Image Studio Lite 5.2 (LI-COR). Primary antibodies were: rabbit anti-C1q (1:1000, Abcam), chicken anti-TH (1:5000, Millipore) and rabbit anti-actine (1:5000, Sigma). Secondary antibodies were: donkey anti-rabbit 800nm (1:5000, LI-COR), donkey anti-chicken 800 nm (1:5000, LI-COR) and donkey anti-rabbit 680nm (1:5000, LI-COR).

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using Prism (GraphPad). The normality of data distribution was tested using Shapiro-Wilk's test. Unpaired t-tests (for normally distributed datasets) or Mann-Whitney tests (for non-normally distributed datasets) were used for comparisons between two groups. For multiple comparisons we used two-way ANOVA followed by Sidak's *post hoc* test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. p -values are reported as follows: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Sidak's *post hoc* test, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$.

Results

Prenatal exposure to MIA decreases VTA DA neurons firing activity in adult mice *in vivo*

To evaluate whether MIA affects DA neuron firing in the VTA, we performed *in vivo* juxtacellular recordings in the adult offspring of dams that had received an intravenous Poly(I:C) injection (5 mg/kg) on gestation day 9 (E9 stage of embryonic development) (**Fig. 1A**). In line with previous results on a rat model of MIA^{31,38}, we observed that prenatal exposure to Poly(I:C) resulted in decreased spontaneous firing activity (control: n = 126 cells from 10 mice; MIA: n = 117 cells from 10 mice; Unpaired t test $p = 0.0052$; Table S2) and diminished percentage of spikes within bursts (control: n = 126 cells from 10 mice; MIA: n = 117 cells from 10 mice; Unpaired t test $p = 0.044$; Table S2) (**Fig. 1B-D**).

To investigate the mechanisms underlying the link between MIA and alterations in DA neuron firing in adult mice, we first combined *ex vivo* electrophysiology and histology to assess MIA-induced changes in intrinsic properties and connectivity of VTA DA neurons. We hypothesized that long-term alterations in DA neurons resulted from changes in connectivity and/or excitability that occurred earlier during postnatal development, and focused on juvenile mice between postnatal days 25 and 30 (P25-P30). This time window was chosen because it falls shortly after the peak turnover of excitatory synapses in the brain, thus allowing to observe changes resulting from a disturbed developmental synaptic refinement, and because the intrinsic properties of DA neurons are already mature at this stage³⁹. To identify DA neurons *ex vivo* in acute brain slices, we took advantage of the *Drd2-EGFP-L10a* mouse line which expresses eGFP under the control of the promoter for the dopamine receptor 2 (D₂R)-encoding gene *Drd2* (**Fig. 2**). To ascertain that eGFP-positive (eGFP+) cells in the VTA were dopaminergic, we performed immunostainings for eGFP and tyrosine hydroxylase (TH), a marker for DA neurons, in brain slices from *Drd2-EGFP-L10a* mice aged P30. We observed that the vast majority of eGFP+ cells in the VTA were also TH+, confirming the DA identity of these neurons ($93.25 \pm 1.3\%$; Table S2). Conversely, $74.36 \pm 3.4\%$ of TH+ cells in the VTA (n = 6 mice) were also GFP+ (Table S2).

VTA D₂R-expressing neurons from MIA-exposed mice present increased intrinsic excitability and enhanced voltage sag reflecting increased HCN-mediated I_h currents

We used *ex vivo* whole-cell patch-clamp to measure intrinsic passive properties in eGFP+ (D₂R+) DA neurons in the VTA. We found that input resistance (control: n = 50 cells from 9

mice; MIA: n = 41 cells from 9 mice; Unpaired t test, $p = 0.93$; Table S2) and cell capacitance (control: n = 50 cells from 9 mice; MIA: n = 41 cells from 9 mice; Unpaired t test, $p = 0.43$; Table S2) were similar in control and MIA offspring (**Fig. 3A**). To assess the intrinsic excitability of the VTA D₂R-expressing DA neurons, we measured the frequency of action potentials fired in response to depolarizing current steps of increasing amplitude. We found that intrinsic excitability was significantly increased in MIA-exposed mice (control: n = 50 cells from 9 mice; MIA: n = 41 cells from 9 mice; two-way RM ANOVA, injection effect: $F_{(1, 89)} = 4.02$, $p = 0.048$; Table S2) (**Fig. 3B**). Thus, decreased firing of VTA DA neurons from MIA offspring *in vivo* is unlikely to be caused by their impaired intrinsic excitability. In the VTA, the presence of hyperpolarization-activated non-selective cation current (I_h current) mediated by hyperpolarization-activated nucleotide-gated channels (HCN channels) is a hallmark of DA neurons. In VTA DA neurons, HCN channels promote firing^{40,41}. Using current-clamp, we observed that VTA D₂R-expressing neurons in MIA offspring showed a larger sag voltage, a voltage change observed in response to cell hyperpolarization and mediated by HCN channels (control: n = 48 cells from 9 mice; MIA: n = 37 cells from 9 mice; two-way RM ANOVA, injection effect: $F_{(1, 83)} = 5.725$, $p = 0.019$; Table S2) (**Fig. 4A**). In line with this result, the amplitude of I_h currents recorded in voltage-clamp mode was also increased in MIA offspring channels (control: n = 17 cells from 4 mice; MIA: n = 10 cells from 4 mice; two-way RM ANOVA, injection effect: $F_{(1, 25)} = 5.902$, $p = 0.0226$; Table S2) (**Fig. 4B**). Together, these results demonstrate that changes in the active properties of DA neurons following MIA cannot account for the decreased firing activity of VTA DA neurons *in vivo*, and likely reflect homeostatic compensations for maintaining firing rates within physiological boundaries.

Prenatal exposure to MIA results in a loss of excitatory synapses in VTA D₂R-expressing neurons

Because the excitatory^{42,43} and inhibitory⁴⁴ inputs received by DA neurons in the VTA influence action potential firing, we then hypothesized that the decrease in the firing activity of VTA DA cells *in vivo* might be due to alterations in synapse number and/or function. To investigate spontaneous GABAergic neurotransmission, we recorded miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs) in eGFP+ neurons *ex vivo* in the VTA from juvenile mice (P25-P30). mIPSC frequency and amplitude were similar in control and MIA offspring (control: n = 22 cells from 7 mice; MIA: n = 18 cells from 6 mice; frequency: Unpaired t test, $p = 0.07$; amplitude: Unpaired t test, $p = 0.19$; Table S2) (**Fig. 5A-B**). To study spontaneous AMPAR-

mediated glutamatergic neurotransmission, we recorded miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) in eGFP+ VTA neurons, and observed significantly decreased mEPSC frequency but no change in mEPSC amplitude in MIA offspring (control: n = 25 cells from 12 mice; MIA: n = 24 cells from 10 mice; frequency: Mann-Whitney test, $p = 0.021$; amplitude: Mann-Whitney test, $p = 0.067$; Table S2) (**Fig. 5C-D**). Decreased mEPSC frequency may result from either decreased probability of neurotransmitter release from the presynaptic site, or from a reduction in the number of functional excitatory synapses. We measured the paired-pulse ratio of eEPSCs, which is sensitive to the probability of neurotransmitter release from presynaptic sites. The paired-pulse ratio was similar in the control and MIA group for every inter-stimulus interval (control: n = 24 cells from 5 mice; MIA: n = 19 cells from 4 mice; two-way RM ANOVA, injection effect: $F_{(1, 41)} = 0.0001819$, $p = 0.99$; Table S2) (**Fig. 5E-F**), suggesting that decreased mEPSC frequency does not result from diminished glutamate release probability at excitatory inputs to VTA DA cells. To directly assess whether MIA affects the number of excitatory synapses in VTA eGFP+ neurons, we measured spine density in the primary dendrite of biocytin-filled neurons. Consistent with decreased mEPSC frequency and unchanged paired-pulse ratio, we found that spine density was significantly reduced in the MIA group (control: n = 13 cells from 5 mice; MIA: n = 9 cells from 5 mice; Mann-Whitney test, $p = 0.0026$; Table S2) (**Fig. 5G-H**). Together, these results indicate that excitatory synaptic inputs to D₂R-expressing DA neurons in the VTA are lower due to decreased synapse density, in the absence of major changes at inhibitory inputs. These observations suggest that the excitatory/inhibitory balance is impaired in VTA DA neurons, which may contribute to diminish their firing frequency *in vivo*.

eGFP-positive neurons from MIA-exposed mice display NMDA_R hypofunction

NMDA_R-mediated currents promote burst firing in DA neurons^{43,45}. To investigate if *in utero* exposition to Poly(I:C) impacts NMDA_R-mediated currents in VTA DA cells, we measured the AMPA/NMDA ratio in VTA eGFP + neurons and found that it was significantly increased in the MIA group (control: n = 20 cells from 4 mice; MIA: n = 15 cells from 5 mice; Unpaired t test, $p = 0.0259$; Table S2) (**Fig. 6A**). mEPSC amplitude is determined by the number of AMPA_R per synapse and was unchanged in MIA offspring (**Fig. 5D**), suggesting that the number of AMPA_R per synapse remained unaltered by MIA. Moreover, we verified that the decay kinetics of NMDA_R-mediated currents, which is dependent on the NMDA_R subunit composition and may influence the measurement of the AMPA/NMDA ratio in our experimental conditions, was unchanged by MIA (control: n = 20 cells from 4 mice; MIA: n =

15 cells from 5 mice; Mann-Whitney test, $p = 0.7798$; Table S2) (**Fig. 6B**). Together, these results indicate that the increased AMPA/NMDA ratio in VTA eGFP+ neurons reflect decreased NMDA_R-mediated currents in MIA offspring, which is likely to contribute to the decreased burst firing of DA neurons in MIA offspring *in vivo*.

Prenatal MIA does alter microglial cells intrinsic properties and increases their phagocytosis activity

We hypothesized that decreased excitatory input to VTA D₂R-expressing neurons (**Fig. 5**) may result from disruptions of the mechanisms involved in developmental synapse refinement. Since microglial cells play a central role in the complement-dependent synaptic pruning in the postnatal brain^{11,12}, we hypothesized that MIA might alter the properties and/or functions of microglial cells at a developmental stage close to the peak of the synaptic refinement period (P15-P18)⁴⁶⁻⁴⁸. We first measured the density of Iba1+ microglial cells in the VTA and found that it was similar in control and MIA offspring aged P15-P18 (control: $n = 9$ mice; MIA: $n = 10$ mice; Unpaired t test, $p = 0.89$; Table S2) (**Fig. 7A-B**). We then performed three-dimensional (3D) reconstructions of individual Iba1+ microglial cells in the VTA of mice aged P15-P18 to assess whether MIA altered their morphological properties. We observed that the volume of microglial cells from MIA offspring was increased (control: $n = 182$ cells from 11 mice; MIA: $n = 142$ cells from 8 mice; Mann-Whitney test, $p = 0.0005$) (**Fig. 7C**) in the absence of soma size alteration (Mann-Whitney test, $p = 0.2253$; Table S2) (**Fig. 7D**). A 3D Sholl Analysis revealed that the increased volume of microglial cells in MIA offspring was associated with an increased complexity (two-way RM ANOVA, injection effect: $F_{(1, 322)} = 5.722$, $p = 0.0173$; Table S2) (**Fig. 7E**) and length of microglial processes (Mann-Whitney test, $p = 0.0064$; Table S2) (**Fig. 7F**).

Since the reactivity of microglial cells correlates with their phagocytosis of synaptic material³³, we examined the size of lysosomes positive for CD68, a transmembrane glycoprotein which is considered as an indicator of microglial phagocytic activity^{49,50}, in microglial cells from the VTA of MIA and control offspring. The volume of CD68+ lysosomal structures within Iba1+ microglial cells did not significantly differ in the two conditions (control: $n = 182$ cells from 11 mice; MIA: $n = 142$ cells from 8 mice; Unpaired t test, $p = 0.88$; Table S2) (**Fig. 8A**). Next, we set out to directly assess the phagocytosis of synaptic material by microglial cells. To this purpose, we performed co-immunostainings for Iba1 and Bassoon, a protein of the presynaptic active zone. We observed that the volume of Bassoon+ synaptic material within Iba1+ VTA microglial cells was significantly increased in MIA offspring (control: $n = 118$ cells from 11

mice; MIA: n = 109 cells from 9 mice; Mann-Whitney test, $p = 0.047$; Table S2) (**Fig. 8B**). To further investigate the mechanisms that may lead to increased phagocytic activity in the MIA group, we measured the expression of C1q, a complement molecule that initiates the classical complement cascade and was shown to be critically involved in microglia-dependent synaptic refinement in the developing visual thalamus and cortex^{51,52}. We found that the expression of C1q was strongly increased in the midbrain of juvenile MIA offspring (control: n = 8 mice; MIA: n = 8 mice; Unpaired t test, $p = 0.0032$; Table S2) (**Fig. 9**). Taken together, these results indicate that MIA increases the phagocytosis of synaptic material by microglial cells in the VTA of juvenile mice, and suggests that increased activity of the complement pathway may contribute to the excess elimination of excitatory synapses in VTA DA neurons from MIA offspring.

Early postnatal minocycline treatment prevents the decreased excitatory synaptic transmission and altered firing activity seen in D₂R-expressing neurons from MIA-exposed mice

In order to study the causal role of microglia in the phenotypes induced by prenatal exposure to Poly(I:C), we administered minocycline to newborn control and MIA offspring during the first two weeks of postnatal life (**Fig. 10A**). The neonatal period was previously shown to be a critical period for the restoration of neuronal and behavioral phenotypes by minocycline in a mouse model of cognitive impairments³³. We found that minocycline treatment rescued the decreased firing activity of VTA DA cells *in vivo* in MIA mice (control: n = 90 cells from 6 mice; MIA: n = 58 cells from 6 mice; frequency: Unpaired t test, $p = 0.94$; spikes within bursts: Unpaired t test, $p = 0.79$; Table S2) (**Fig. 10B-D**). Furthermore, mEPSC frequency became similar in minocycline-treated control and MIA offspring (control: n = 11 cells from 3 mice; MIA: n = 12 cells from 3 mice; frequency: Mann-Whitney test, $p = 0.555$; amplitude: Unpaired t test, $p = 0.5567$; Table S2) (**Fig. 10E-F**). Although minocycline may have pleiotropic effects, our results suggest that DA neuron firing activity *in vivo* and mEPSC frequency *ex vivo* may be at least partly rescued by microglia modulation.

Discussion

MIA has been shown to cause long-lasting impairments of DA neuron function in a rat MIA model, but the underlying mechanisms are still largely unresolved. Here, we verified that MIA also leads to similar DA abnormalities in the offspring of Poly(I:C)-exposed mouse dams. Our results show that firing activity and, specifically, burst firing were diminished in DA neurons in the VTA *in vivo* in MIA offspring. MIA caused distinct alterations in the active properties of VTA D₂R-expressing DA neurons, including increased intrinsic excitability and enhanced I_h currents. These changes, however, are unlikely to account for the decreased *in vivo* activity of DA neurons. We also identified reduced functional glutamatergic inputs to VTA DA neurons, which was accompanied by reduced spine density and decreased NMDA_R function, in MIA offspring. Interestingly, MIA appeared not to affect functional GABAergic inputs. Microglial morphology, but not phagocytic capacity indexed by the expression of CD68, was slightly changed in the VTA of MIA offspring, suggesting altered reactivity. Moreover, our results indicate higher engulfment of synaptic material by microglia following MIA. This is also supported by enhanced expression of complement C1q, a major driver of microglia-mediated synaptic pruning in thalamic and cortical structures. Finally, we report that minocycline, a brain-penetrant tetracycline that alters the reactivity of microglial cells, suppresses the long-term MIA-induced consequences on DA neuron input connectivity and *in vivo* firing activity.

Changes in the active properties of DA neurons in MIA offspring

Our results suggest a general reduction in the activity of DA neurons in the VTA of MIA offspring. The firing activity of the DA cells depends on their intrinsic properties but also on the excitatory and inhibitory inputs that they receive. We observed that D₂R-expressing neurons in MIA offspring show increased intrinsic excitability, i.e., fire more action potentials in response to depolarizing currents, which is at odds with their decreased activity *in vivo* and likely reflects homeostatic compensations⁵³. The HCN channel – mediated I_h current is a characteristic feature of DA cells in the VTA⁴¹. Through their expression in dendrites and soma of DA neurons, HCN channels promote action potential firing, participate in the inputs integration⁴⁰ and exhibit both excitatory as well as inhibitory effects⁵⁴. The reversal potential of HCN channels is between -50 and -20mV⁵⁵. Thus, their opening depolarizes the neuron and maintain its membrane potential close to the resting membrane potential⁵⁶ (between -55 and -40mV⁴⁰) which influences the firing properties of DA cells. ZD7288, a HCN channel inhibitor,

reduces the firing frequency of DA neurons^{57,58}. We observed that D₂R-expressing neurons from MIA-exposed mice exhibit an enhanced I_h current, which might reflect increased HCN expression or function. Therefore, it is unlikely that the positive modulation of I_h currents is responsible for the decreased activity *in vivo*.

In VTA DA neurons, HCN channels are predominantly expressed in the dendrites⁵⁹ with a density gradient, giving them a prominent role in influencing the firing pattern of the cells through normalization and filtering of synaptic inputs⁵⁶. Since hyperpolarization opens HCN channels, the depolarizing conductance they mediate in dendrites suppresses the hyperpolarizing conductance induced by inhibitory synaptic inputs⁶⁰. Moreover, HCN channels participate in the integration of excitatory synaptic potentials. Indeed, their presence in a gradient along the neuronal dendritic tree counteracts passive dendritic filtering, allowing synchrony of the distal and proximal excitatory inputs when recorded at the cell soma⁵⁴. Finally, I_h currents are modulated by several regulators, such as cAMP promoting the phosphorylation of HCN channels by protein kinase A (PKA)^{40,61}, activation of potassium and calcium channels, and intracellular Ca²⁺ levels⁵⁵. Lastly, HCN conductance is also indirectly regulated by neuromodulators of the cAMP levels, such as serotonin and norepinephrine^{62,63}, which both are involved in the regulation of dopamine neurotransmission^{64,65}. Thus, multiple mechanisms might be involved in the homeostatic regulation of I_h currents in VTA DA neurons from MIA offspring. It remains possible that increased expression or function of HCN channels reduces the ability of DA neurons to fire action potentials through shunting inhibition, but this effect is likely to be negligible, since intrinsic excitability is overall increased, and because the input resistance at resting membrane potential is unchanged in the MIA group.

Loss of excitatory inputs and long-term decrease in neuronal activity

VTA DA neurons receive multiple afferents from distinct brain structures⁶⁶. In particular, the excitatory inputs that they receive from the prefrontal cortex⁶⁷⁻⁶⁹, the pedunculopontine nucleus^{70,71} and the bed nucleus of the stria terminalis⁷² promote burst firing and phasic dopamine release. Exposure to prenatal inflammation induced by injection of Poly(I:C) to the mother significantly decreased the number of functional excitatory synapses onto D₂R-expressing neurons, without affecting functional inhibitory inputs. These observations are consistent with previous studies on MIA offspring which revealed decreased spine density in hippocampal⁷³ and cortical⁹ neurons. Since DA cells firing patterns depend on the excitatory inputs they receive, decreased excitatory transmission received by D₂R-expressing DA neurons is likely to contribute to the decreased firing rate *in vivo*. Further investigations would be

required, however, to establish whether distinct excitatory afferents from the different brain regions targeting the VTA are similarly affected by MIA.

Decreased burst firing and NMDA hypofunction

Importantly, decreased burst firing of DA neurons *in vivo* in MIA offspring may reflect specific changes in the mode of dopamine release, since phasic release is favored by action potentials fired in bursts, while tonic release is associated with regular firing⁷⁴. In this context, the reduced NMDA_R function that we observed in MIA offspring is likely to have functional implications for DA neuron function. Based in particular on the fact that the intake of NMDA_R antagonists (e.g., phencyclidine and ketamine) induces psychotic symptoms such as depersonalization, it has been proposed that NMDA_R hypofunction may be implicated in ASD⁷⁵ and schizophrenia^{76,77}. Decreased relative NMDA_R contribution to synaptic currents in hippocampal neurons⁶ is part of the alterations in synapse function that have been identified in the brain of MIA offspring. Interestingly, the phasic firing of the DA cells is triggered by NMDA_R-mediated currents, but not AMPA_R-mediated currents^{42,43,45}. NMDA_R function is dependent on the number of NMDA_R present at the post-synaptic site of excitatory synapses but also on the NMDA_R subunit composition, which determines the quantity of ions passing through the receptor when it opens. The subunit composition of heterotetrameric NMDA_R changes during development, with a switch from the GluN2B subunit conferring slow deactivation kinetics to the faster GluN2A subunit, during the first two postnatal weeks^{78,79}. This switch is unlikely to be altered by MIA, since the decay time kinetics of NMDA_R remains unchanged in the offspring of Poly(I:C)-injected mothers. Thus, decreased NMDA_R-mediated transmission may reflect a loss of the average number or a modification of channel properties of NMDA_R at functional glutamatergic synapses, resulting in NMDA_R hypofunction and decreased burst firing. It is noteworthy that immature synapses are characterized by a high proportion of NMDA_R and a low proportion of AMPA_R. Thus, lack of stabilization or preferential pruning of “weak” immature synapses by microglial cells may account for decreased NMDA_R-mediated currents in MIA offspring. However, our results do not preclude altered trafficking of NMDA_R to the synapse or active removal of NMDA_R from synaptic sites as a consequence of MIA.

MIA increases complement expression and microglia-dependent synaptic pruning in the VTA

Brain inflammation¹⁴ and persistent changes in the properties of microglial cells¹⁵ have been reported in the brain of ASD and schizophrenia patients. Indeed, *post-mortem* studies on brain tissue have uncovered alterations in microglial cells density^{80–82} in the cortex of both ASD and schizophrenia patients, as well as elevated cytokine levels^{83,84}. However, some discrepancies with respect to microglia density and morphological features are found in the literature, and may be attributed to the brain structures studied, to the stage of the disease as well as the staining marker used to detect microglia^{15,80,85–88}. In rodent models of Poly(I:C)-induced MIA, the properties of microglial cells differ across studies, even though MIA was performed at the same embryonic stage (E9). While some studies do not report any changes in microglial cells density and morphological features^{89–93}, others show increased microglia density¹⁸. Microglia density might be differentially affected in distinct brain regions. Indeed, in rat MIA model, microglia density was found to be increased in the hippocampus and the striatum, but not in the prefrontal cortex⁹⁴. It is important to emphasize that all of these studies were carried out in forebrain structures, including the cortex, the hippocampus and the nucleus accumbens, while little is known about the properties of the microglial cells and their role in midbrain development. In the VTA in P15- to P18-old MIA offspring, we observed that the volume of microglial cells was slightly increased, which was largely due to longer and more complex microglial processes. This morphological profile is associated with a ramified state of microglia which is associated with blunted reactivity⁹⁵. In line with a recent transcriptomic study showing that microglia from MIA offspring have a long-lived decrease in immune reactivity⁹³, our results may suggest that exposition to prenatal immune activation changes microglial properties towards a “blunted reactivity” state in the postnatal brain. We found that microglia density was not affected by MIA. MIA did not affect the volume of CD68+ lysosomes within Iba1+ cells. CD68 has been identified as a phagocytic marker in microglial cell, but its function in microglial cells and phagocytosis is unclear^{96,97}. The size of lysosomes may not by itself dictate the phagocytic activity of microglial cells, which is also dependent on other factors, such as the detection (opsonization) of complement-tagged synaptic material for subsequent engulfment^{11,52}. Indeed, we found that the engulfment of Bassoon+ synaptic material is higher in the VTA of MIA offspring, suggesting increased phagocytic activity independently of the size of CD68+ lysosomes. Interestingly, cortical microglia properties in a mouse model of genetic x environment interactions (DISC1 heterozygosity x MIA) displayed some similarities with VTA microglia properties reported here, including longer processes and increased

engulfment of synaptic material. In this mouse model, neuronal and behavioral phenotypes were reversed by minocycline administration in the early postnatal period³³. In line with these results, we found that minocycline treatment from P1 to P15 prevented the loss of excitatory inputs and normalized action potential firing in VTA DA neurons from MIA offspring. While we cannot rule out off-target effects of minocycline administration, the well-demonstrated action of minocycline as a modulator of microglia inflammatory response⁹⁸ and the role of microglia in developmental synaptic refinement strongly suggest that microglia is involved in the long-lasting effects of MIA on DA neuron properties, including decreased burst firing *in vivo*. Our observation that complement C1q expression is elevated in the VTA of MIA offspring further supports the notion that complement-mediated synaptic refinement by microglial cells determines DA neuronal phenotypes in MIA offspring. In the brain, C1q is mostly expressed by microglial cells and activates the classical complement cascade which culminates with the cleavage of complement C3 into C3a and C3b. C3b, after further cleavage, gives rise to iC3b, an agonist of CR3 receptors that in the brain are exclusively expressed by microglial cells and are involved in synaptic tagging for microglial elimination^{11,52}. On the other hand, C3a is recognized by C3aR on microglial cells, which can activate microglial cells⁹⁹. Thus, elevated C1q expression and excess activation of the complement pathway may disturb synaptic refinement in the VTA through distinct actions of microglial cells. Further studies using mice with ablation of distinct complement receptors will be necessary to disentangle the role of distinct complement receptors in MIA-induced neuronal phenotypes in the VTA.

Conclusion

Overall, our results are consistent with a model whereby MIA causes aberrant synaptic refinement by VTA microglial cells, possibly due to increased complement activity, which impairs excitatory/inhibitory balance and reduces NMDA_R function in VTA DA neurons, in turn leading to long-lasting abnormalities in VTA DA neuron firing. This bears consequences for the pathophysiology of the major psychiatric disorders for which MIA is a risk factor, and which are associated with disturbances of the dopaminergic system, such as ASD and schizophrenia. Indeed, our results support the notion that patients stratified according their history of MIA, or according to markers of brain inflammation, may benefit from therapeutic strategies targeting microglial function and/or complement activity at the early stages of the disease.

Acknowledgements

We thank the *Cell and Tissue Imaging Facility* of the Institut du Fer à Moulin (Theano Eirinopoulou, Mythili Savariradjane), where all image acquisitions and analyses have been performed, and the staff of the IFM animal facility (Baptiste Lecomte, Gaël Grannec, Anna-Sophia Mourenco, Emma Courteau and Eloise Marsan). We are grateful to Dr Jean Antoine Girault and Dr Denis Hervé for the gift of *Drd2-EGFP-L10a* mice. CD and ET were the recipients of PhD fellowships from the Physiology, Physiopathology and Therapeutics Doctoral School (ED 394) of Sorbonne University. TL was the recipient of a PhD fellowship from the Brain, Cognition and Behavior Doctoral School (ED 158) of Sorbonne University. This work was supported by INSERM and Sorbonne University, and grants from ERANET-Neuron (MicroSchiz, ANR-18-NEUR-0008-02) and Fondation de France (FDF #00112562) to C.L.M.

References

1. Meyer, U. (2019). Neurodevelopmental Resilience and Susceptibility to Maternal Immune Activation. *Trends in Neurosciences* 42, 793–806. 10.1016/j.tins.2019.08.001.
2. Choi, G.B., Yim, Y.S., Wong, H., Kim, S., Kim, H., Kim, S.V., Hoeffler, C.A., Littman, D.R., and Huh, J.R. (2016). The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science* 351, 933–939. 10.1126/science.aad0314.
3. Meyer, U., Murray, P.J., Urwyler, A., Yee, B.K., Schedlowski, M., and Feldon, J. (2008). Adult behavioral and pharmacological dysfunctions following disruption of the fetal brain balance between pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory signaling. *Mol Psychiatry* 13, 208–221. 10.1038/sj.mp.4002042.
4. Zuckerman, L., Rehavi, M., Nachman, R., and Weiner, I. (2003). Immune Activation During Pregnancy in Rats Leads to a PostPubertal Emergence of Disrupted Latent Inhibition, Dopaminergic Hyperfunction, and Altered Limbic Morphology in the Offspring: A Novel Neurodevelopmental Model of Schizophrenia. *Neuropsychopharmacol* 28, 1778–1789. 10.1038/sj.npp.1300248.
5. Taber, K.H., Salpekar, J., Wong, A.H.C., Hurley, R.A., Hurley, R.A., Hayman, L.A., and Taber, K.H. (2011). Developmental Origins for Neuropsychiatric Illness. *JNP* 23, 1–5. 10.1176/jnp.23.1.jnp1.
6. Roumier, A., Pascual, O., Béchade, C., Wakselman, S., Ponce, J.-C., Réal, E., Triller, A., and Bessis, A. (2008). Prenatal Activation of Microglia Induces Delayed Impairment of Glutamatergic Synaptic Function. *PLoS ONE* 3, e2595. 10.1371/journal.pone.0002595.
7. Ito, H.T., Smith, S.E.P., Hsiao, E., and Patterson, P.H. (2010). Maternal immune activation alters nonspatial information processing in the hippocampus of the adult offspring. *Brain, Behavior, and Immunity* 24, 930–941. 10.1016/j.bbi.2010.03.004.
8. Elmer, B.M., Estes, M.L., Barrow, S.L., and McAllister, A.K. (2013). MHCI Requires MEF2 Transcription Factors to Negatively Regulate Synapse Density during Development and in Disease. *Journal of Neuroscience* 33, 13791–13804. 10.1523/JNEUROSCI.2366-13.2013.
9. Coiro, P., Padmashri, R., Suresh, A., Spartz, E., Pendyala, G., Chou, S., Jung, Y., Meays, B., Roy, S., Gautam, N., et al. (2015). Impaired synaptic development in a maternal immune activation mouse model of neurodevelopmental disorders. *Brain Behav Immun* 50, 249–258. 10.1016/j.bbi.2015.07.022.
10. Canetta, S., Bolkan, S., Padilla-Coreano, N., Song, L.J., Sahn, R., Harrison, N.L., Gordon, J.A., Brown, A., and Kellendonk, C. (2016). Maternal immune activation leads to selective functional deficits in offspring parvalbumin interneurons. *Mol Psychiatry* 21, 956–968. 10.1038/mp.2015.222.
11. Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Barres, B.A., and Stevens, B. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron* 74, 691–705. 10.1016/j.neuron.2012.03.026.

12. Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., et al. (2011). Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science* 333, 1456–1458. 10.1126/science.1202529.
13. Han, V.X., Patel, S., Jones, H.F., and Dale, R.C. (2021). Maternal immune activation and neuroinflammation in human neurodevelopmental disorders. *Nat Rev Neurol* 17, 564–579. 10.1038/s41582-021-00530-8.
14. Vargas, D.L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A.W., and Pardo, C.A. (2005). Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Annals of Neurology* 57, 67–81. 10.1002/ana.20315.
15. Gober, R., Ardalan, M., Shiadeh, S.M.J., Duque, L., Garamszegi, S.P., Ascona, M., Barreda, A., Sun, X., Mallard, C., and Vontell, R.T. (2022). Microglia activation in postmortem brains with schizophrenia demonstrates distinct morphological changes between brain regions. *Brain Pathology* 32, e13003. 10.1111/bpa.13003.
16. Mattei, D., Ivanov, A., Ferrai, C., Jordan, P., Guneykaya, D., Buonfiglioli, A., Schaafsma, W., Przanowski, P., Deuther-Conrad, W., Brust, P., et al. (2017). Maternal immune activation results in complex microglial transcriptome signature in the adult offspring that is reversed by minocycline treatment. *Transl Psychiatry* 7, e1120–e1120. 10.1038/tp.2017.80.
17. Traetta, M.E., and Tremblay, M.-È. (2022). Prenatal inflammation shapes microglial immune response into adulthood. *Trends in Immunology* 43, 953–955. 10.1016/j.it.2022.10.009.
18. Zhu, F., Zheng, Y., Liu, Y., Zhang, X., and Zhao, J. (2014). Minocycline alleviates behavioral deficits and inhibits microglial activation in the offspring of pregnant mice after administration of polyriboinosinic-polyribocytidilic acid. *Psychiatry Res* 219, 680–686. 10.1016/j.psychres.2014.06.046.
19. Cheng, S., Hou, J., Zhang, C., Xu, C., Wang, L., Zou, X., Yu, H., Shi, Y., Yin, Z., and Chen, G. (2015). Minocycline reduces neuroinflammation but does not ameliorate neuron loss in a mouse model of neurodegeneration. *Sci Rep* 5, 10535. 10.1038/srep10535.
20. Sellgren, C.M., Gracias, J., Watmuff, B., Biag, J.D., Thanos, J.M., Whittredge, P.B., Fu, T., Worringer, K., Brown, H.E., Wang, J., et al. (2019). Increased synapse elimination by microglia in schizophrenia patient-derived models of synaptic pruning. *Nat Neurosci* 22, 374–385. 10.1038/s41593-018-0334-7.
21. Solmi, M., Veronese, N., Thapa, N., Facchini, S., Stubbs, B., Fornaro, M., Carvalho, A.F., and Correll, C.U. (2017). Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of minocycline in schizophrenia. *CNS Spectr.* 22, 415–426. 10.1017/S1092852916000638.
22. Feinberg, I. (1982). Schizophrenia: caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? *J Psychiatr Res* 17, 319–334. 10.1016/0022-3956(82)90038-3.

23. Onwordi, E.C., Halff, E.F., Whitehurst, T., Mansur, A., Cotel, M.-C., Wells, L., Creeneey, H., Bonsall, D., Rogdaki, M., Shatalina, E., et al. (2020). Synaptic density marker SV2A is reduced in schizophrenia patients and unaffected by antipsychotics in rats. *Nat Commun* *11*, 246. 10.1038/s41467-019-14122-0.
24. MacDonald, M.L., Alhassan, J., Newman, J.T., Richard, M., Gu, H., Kelly, R.M., Sampson, A.R., Fish, K.N., Penzes, P., Wills, Z.P., et al. (2017). Selective Loss of Smaller Spines in Schizophrenia. *Am J Psychiatry* *174*, 586–594. 10.1176/appi.ajp.2017.16070814.
25. Glantz, L.A., and Lewis, D.A. (2000). Decreased Dendritic Spine Density on Prefrontal Cortical Pyramidal Neurons in Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* *57*, 65. 10.1001/archpsyc.57.1.65.
26. de Bartolomeis, A., Barone, A., Vellucci, L., Mazza, B., Austin, M.C., Iasevoli, F., and Ciccarelli, M. (2022). Linking Inflammation, Aberrant Glutamate-Dopamine Interaction, and Post-synaptic Changes: Translational Relevance for Schizophrenia and Antipsychotic Treatment: a Systematic Review. *Mol Neurobiol* *59*, 6460–6501. 10.1007/s12035-022-02976-3.
27. Arias-Carrión, O., Stamelou, M., Murillo-Rodríguez, E., Menéndez-González, M., and Pöppel, E. (2010). Dopaminergic reward system: a short integrative review. *Int Arch Med* *3*, 24. 10.1186/1755-7682-3-24.
28. Lammel, S., Lim, B.K., Ran, C., Huang, K.W., Betley, M.J., Tye, K.M., Deisseroth, K., and Malenka, R.C. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* *491*, 212–217. 10.1038/nature11527.
29. Pavál, D. (2017). A Dopamine Hypothesis of Autism Spectrum Disorder. *Dev Neurosci* *39*, 355–360. 10.1159/000478725.
30. McCutcheon, R.A., Krystal, J.H., and Howes, O.D. (2020). Dopamine and glutamate in schizophrenia: biology, symptoms and treatment. *World Psychiatry* *19*, 15–33. 10.1002/wps.20693.
31. Lecca, S., Luchicchi, A., Scherma, M., Fadda, P., Muntoni, A.L., and Pistis, M. (2019). Δ 9-Tetrahydrocannabinol During Adolescence Attenuates Disruption of Dopamine Function Induced in Rats by Maternal Immune Activation. *Front Behav Neurosci* *13*, 202. 10.3389/fnbeh.2019.00202.
32. De Felice, M., Melis, M., Aroni, S., Muntoni, A.L., Fanni, S., Frau, R., Devoto, P., and Pistis, M. (2019). The PPAR α agonist fenofibrate attenuates disruption of dopamine function in a maternal immune activation rat model of schizophrenia. *CNS Neurosci Ther* *25*, 549–561. 10.1111/cns.13087.
33. Chini, M., Pöppel, J.A., Lindemann, C., Carol-Perdiguer, L., Hnida, M., Oberländer, V., Xu, X., Ahlbeck, J., Bitzenhofer, S.H., Mulert, C., et al. (2020). Resolving and Rescuing Developmental Miswiring in a Mouse Model of Cognitive Impairment. *Neuron* *105*, 60-74.e7. 10.1016/j.neuron.2019.09.042.
34. Luzi, P., Abraham, R.M., Rafi, M.A., Curtis, M., Hooper, D.C., and Wenger, D.A. (2009). EFFECTS OF TREATMENTS ON INFLAMMATORY AND APOPTOTIC

MARKERS IN THE CNS OF MICE WITH GLOBOID CELL LEUKODYSTROPHY. *Brain Res* 1300, 146–158. 10.1016/j.brainres.2009.09.017.

35. Paxinos, G., and Watson, C. (2007). *The Rats Brain in Stereotaxic Coordinates* 6th ed. (Elsevier).
36. Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Heller, C.T., and Stevens, B. (2014). An engulfment assay: a protocol to assess interactions between CNS phagocytes and neurons. *J Vis Exp*, 51482. 10.3791/51482.
37. Althammer, F., Ferreira-Neto, H.C., Rubaharan, M., Roy, R.K., Patel, A.A., Murphy, A., Cox, D.N., and Stern, J.E. (2020). Three-dimensional morphometric analysis reveals time-dependent structural changes in microglia and astrocytes in the central amygdala and hypothalamic paraventricular nucleus of heart failure rats. *J Neuroinflammation* 17, 221. 10.1186/s12974-020-01892-4.
38. Luchicchi, A., Lecca, S., Melis, M., De Felice, M., Cadeddu, F., Frau, R., Muntoni, A.L., Fadda, P., Devoto, P., and Pistis, M. (2016). Maternal Immune Activation Disrupts Dopamine System in the Offspring. *Int J Neuropsychopharmacol* 19, pyw007. 10.1093/ijnp/pyw007.
39. Bayer, Shirley A., Wills, Katherine V., Triarhou, Lazaros C., and Ghetti, B. (1995). Time of neuron origin and gradients of neurogenesis in midbrain dopaminergic neurons in the mouse. *Exp Brain Res* 105. 10.1007/BF00240955.
40. Chu, H., and Zhen, X. (2010). Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in the regulation of midbrain dopamine systems. *Acta Pharmacol Sin* 31, 1036–1043. 10.1038/aps.2010.105.
41. Wanat, M.J., Hopf, F.W., Stuber, G.D., Phillips, P.E.M., and Bonci, A. (2008). Corticotropin-releasing factor increases mouse ventral tegmental area dopamine neuron firing through a protein kinase C-dependent enhancement of I_h : CRF increases VTA dopamine neuron firing. *The Journal of Physiology* 586, 2157–2170. 10.1113/jphysiol.2007.150078.
42. Overton, P.G., and Clark, D. (1997). Burst firing in midbrain dopaminergic neurons. *Brain Research Reviews* 25, 312–334. 10.1016/S0165-0173(97)00039-8.
43. Chergui, K., Charléty, P.J., Akaoka, H., Saunier, C.F., Brunet, J.-L., Buda, M., Svensson, T.H., and Chouvet, G. (1993). Tonic Activation of NMDA Receptors Causes Spontaneous Burst Discharge of Rat Midbrain Dopamine Neurons In Vivo. *European Journal of Neuroscience* 5, 137–144. 10.1111/j.1460-9568.1993.tb00479.x.
44. Seutin, V., John, S.W.M., and North, R.A. (1994). EFFECT OF DOPAMINE AND BACLOFEN ON α -METHYL-D-ASPARTATE-INDUCES BURST FIRING IN RAT VENTRAL TEGMENTAL NEURON. *Neuroscience* 58, 201–206.
45. Deister, C.A., Teagarden, M.A., Wilson, C.J., and Paladini, C.A. (2009). An Intrinsic Neuronal Oscillator Underlies Dopaminergic Neuron Bursting. *Journal of Neuroscience* 29, 15888–15897. 10.1523/JNEUROSCI.4053-09.2009.

46. Zuo, Y., Lin, A., Chang, P., and Gan, W.-B. (2005). Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron* 46, 181–189. 10.1016/j.neuron.2005.04.001.
47. Holtmaat, A.J.G.D., Trachtenberg, J.T., Wilbrecht, L., Shepherd, G.M., Zhang, X., Knott, G.W., and Svoboda, K. (2005). Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron* 45, 279–291. 10.1016/j.neuron.2005.01.003.
48. Cruz-Martín, A., Crespo, M., and Portera-Cailliau, C. (2010). Delayed stabilization of dendritic spines in fragile X mice. *J Neurosci* 30, 7793–7803. 10.1523/JNEUROSCI.0577-10.2010.
49. Damoiseaux, J.G., Döpp, E.A., Calame, W., Chao, D., MacPherson, G.G., and Dijkstra, C.D. (1994). Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology* 83, 140–147.
50. Guillemin, G.J., and Brew, B.J. (2004). Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *Journal of Leukocyte Biology* 75, 388–397. 10.1189/jlb.0303114.
51. Chu, Y., Jin, X., Parada, I., Pesic, A., Stevens, B., Barres, B., and Prince, D.A. (2010). Enhanced synaptic connectivity and epilepsy in C1q knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 7975–7980. 10.1073/pnas.0913449107.
52. Stevens, B., Allen, N.J., Vazquez, L.E., Howell, G.R., Christopherson, K.S., Nouri, N., Micheva, K.D., Mehalow, A.K., Huberman, A.D., Stafford, B., et al. (2007). The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell* 131, 1164–1178. 10.1016/j.cell.2007.10.036.
53. Desai, N.S., Rutherford, L.C., and Turrigiano, G.G. (1999). Plasticity in the intrinsic excitability of cortical pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 2, 515–520. 10.1038/9165.
54. Combe, C.L., and Gasparini, S. (2021). Ih from synapses to networks: HCN channel functions and modulation in neurons. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 166, 119–132. 10.1016/j.pbiomolbio.2021.06.002.
55. Pape, H.C. (1996). Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* 58, 299–327. 10.1146/annurev.ph.58.030196.001503.
56. Kase, D., and Imoto, K. (2012). The Role of HCN Channels on Membrane Excitability in the Nervous System. *Journal of Signal Transduction* 2012, 1–11. 10.1155/2012/619747.
57. Neuhoff, H., Neu, A., Liss, B., and Roeper, J. (2002). Ih Channels Contribute to the Different Functional Properties of Identified Dopaminergic Subpopulations in the Midbrain. *J Neurosci* 22, 1290–1302. 10.1523/JNEUROSCI.22-04-01290.2002.
58. Okamoto, T., Harnett, M.T., and Morikawa, H. (2006). Hyperpolarization-Activated Cation Current (I_h) Is an Ethanol Target in Midbrain Dopamine Neurons of Mice. *Journal of Neurophysiology* 95, 619–626. 10.1152/jn.00682.2005.

59. Arencibia-Albite, F., Paladini, C., Williams, J.T., and Jiménez-Rivera, C.A. (2007). Noradrenergic modulation of the hyperpolarization-activated cation current (I_h) in dopamine neurons of the ventral tegmental area. *Neuroscience* 149, 303–314. 10.1016/j.neuroscience.2007.08.009.
60. Atherton, J.F., Kitano, K., Baufreton, J., Fan, K., Wokosin, D., Tkatch, T., Shigemoto, R., Surmeier, D.J., and Bevan, M.D. (2010). Selective Participation of Somatodendritic HCN Channels in Inhibitory But Not Excitatory Synaptic Integration in Neurons of the Subthalamic Nucleus. *Journal of Neuroscience* 30, 16025–16040. 10.1523/JNEUROSCI.3898-10.2010.
61. Pedarzani, P., and Storm, J.F. (1995). Protein kinase A-independent modulation of ion channels in the brain by cyclic AMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 11716–11720. 10.1073/pnas.92.25.11716.
62. Seeds, N.W., and Gilman, A.G. (1971). Norepinephrine Stimulated Increase of Cyclic AMP Levels in Developing Mouse Brain Cell Cultures. *Science, New Series* 174, 292.
63. Pape, H.-C., and McCormick, D.A. (1989). Noradrenaline and serotonin selectively modulate thalamic burst firing by enhancing a hyperpolarization-activated cation current. *Nature* 340, 715–718. 10.1038/340715a0.
64. Guiard, B.P., El Mansari, M., and Blier, P. (2008). Cross-talk between dopaminergic and noradrenergic systems in the rat ventral tegmental area, locus ceruleus, and dorsal hippocampus. *Mol Pharmacol* 74, 1463–1475. 10.1124/mol.108.048033.
65. Alex, K.D., and Pehek, E.A. (2007). Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. *Pharmacology & Therapeutics* 113, 296–320. 10.1016/j.pharmthera.2006.08.004.
66. Morales, M., and Margolis, E.B. (2017). Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 18, 73–85. 10.1038/nrn.2016.165.
67. Gariano, R.F., and Groves, P.M. (1988). Burst firing induced in midbrain dopamine neurons by stimulation of the medial prefrontal and anterior cingulate cortices. *Brain Research* 462, 194–198. 10.1016/0006-8993(88)90606-3.
68. Lodge, D.J. (2011). The Medial Prefrontal and Orbitofrontal Cortices Differentially Regulate Dopamine System Function. *Neuropsychopharmacol* 36, 1227–1236. 10.1038/npp.2011.7.
69. Zhang, X., and Shi, W. (1999). Dendritic glutamate-induced bursting in prefrontal pyramidal cells: role of NMDA and non-NMDA receptors. *Acta Pharmacologica Sinica* 20, 1125131–1121131.
70. Floresco, S.B., West, A.R., Ash, B., Moore, H., and Grace, A.A. (2003). Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nat Neurosci* 6, 968–973. 10.1038/nn1103.
71. Sesack, S.R., and Grace, A.A. (2010). Cortico-Basal Ganglia Reward Network: Microcircuitry. *Neuropsychopharmacol* 35, 27–47. 10.1038/npp.2009.93.

72. Georges, F., and Aston-Jones, G. (2001). Potent Regulation of Midbrain Dopamine Neurons by the Bed Nucleus of the Stria Terminalis. *J. Neurosci.* *21*, RC160–RC160. 10.1523/JNEUROSCI.21-16-j0003.2001.
73. Sanchez-Mendoza, E.H., Camblor-Perujo, S., Martins Nascentes-Melo, L., Dzyubenko, E., Fleischer, M., Silva de Carvalho, T., Schmitt, L.-I., Leo, M., Hagenacker, T., Herring, A., et al. (2020). Compromised Hippocampal Neuroplasticity in the Interferon- α and Toll-like Receptor-3 Activation-Induced Mouse Depression Model. *Mol Neurobiol* *57*, 3171–3182. 10.1007/s12035-020-01927-0.
74. Liu, C., Goel, P., and Kaeser, P.S. (2021). Spatial and temporal scales of dopamine transmission. *Nat Rev Neurosci* *22*, 345–358. 10.1038/s41583-021-00455-7.
75. Carlsson, M.L. (1998). Hypothesis: Is infantile autism a hypoglutamatergic disorder? Relevance of glutamate – serotonin interactions for pharmacotherapy. *J Neural Transm* *105*, 525. 10.1007/s007020050076.
76. Beck, K., Hindley, G., Borgan, F., Ginestet, C., McCutcheon, R., Brugger, S., Driesen, N., Ranganathan, M., D'Souza, D.C., Taylor, M., et al. (2020). Association of Ketamine With Psychiatric Symptoms and Implications for Its Therapeutic Use and for Understanding Schizophrenia. *JAMA Netw Open* *3*, e204693. 10.1001/jamanetworkopen.2020.4693.
77. Krystal, J.H., Perry, E.B., Jr, Gueorguieva, R., Belger, A., Madonick, S.H., Abi-Dargham, A., Cooper, T.B., MacDougall, L., Abi-Saab, W., and D'Souza, D.C. (2005). Comparative and Interactive Human Psychopharmacologic Effects of Ketamine and Amphetamine: Implications for Glutamatergic and Dopaminergic Model Psychoses and Cognitive Function. *Archives of General Psychiatry* *62*, 985–995. 10.1001/archpsyc.62.9.985.
78. Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., and Seeburg, P.H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* *12*, 529–540. 10.1016/0896-6273(94)90210-0.
79. Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., and Seeburg, P.H. (1992). Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* *256*, 1217–1221. 10.1126/science.256.5060.1217.
80. Morgan, J.T., Chana, G., Pardo, C.A., Achim, C., Semendeferi, K., Buckwalter, J., Courchesne, E., and Everall, I.P. (2010). Microglial Activation and Increased Microglial Density Observed in the Dorsolateral Prefrontal Cortex in Autism. *Biological Psychiatry* *68*, 368–376. 10.1016/j.biopsych.2010.05.024.
81. Fillman, S.G., Cloonan, N., Catts, V.S., Miller, L.C., Wong, J., McCrossin, T., Cairns, M., and Weickert, C.S. (2013). Increased inflammatory markers identified in the dorsolateral prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. *Mol Psychiatry* *18*, 206–214. 10.1038/mp.2012.110.

82. Radewicz, K., Garey, L.J., Gentleman, S.M., and Reynolds, R. (2000). Increase in HLA-DR Immunoreactive Microglia in Frontal and Temporal Cortex of Chronic Schizophrenics. *J Neuropathol Exp Neurol* 59, 137–150. 10.1093/jnen/59.2.137.
83. Garbett, K., Ebert, P.J., Mitchell, A., Lintas, C., Manzi, B., Mirnics, K., and Persico, A.M. (2008). Immune transcriptome alterations in the temporal cortex of subjects with autism. *Neurobiology of Disease* 30, 303–311. 10.1016/j.nbd.2008.01.012.
84. Garver, D.L., Tamas, R.L., and Holcomb, J.A. (2003). Elevated Interleukin-6 in the Cerebrospinal Fluid of a Previously Delineated Schizophrenia Subtype. *Neuropsychopharmacol* 28, 1515–1520. 10.1038/sj.npp.1300217.
85. Hercher, C., Chopra, V., and Beasley, C.L. (2014). Evidence for morphological alterations in prefrontal white matter glia in schizophrenia and bipolar disorder. *jpn* 39, 376–385. 10.1503/jpn.130277.
86. Steiner, J., Bielau, H., Brisch, R., Danos, P., Ullrich, O., Mawrin, C., Bernstein, H.-G., and Bogerts, B. (2008). Immunological aspects in the neurobiology of suicide: elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide. *J Psychiatr Res* 42, 151–157. 10.1016/j.jpsychires.2006.10.013.
87. Steiner, J., Mawrin, C., Ziegeler, A., Bielau, H., Ullrich, O., Bernstein, H.-G., and Bogerts, B. (2006). Distribution of HLA-DR-positive microglia in schizophrenia reflects impaired cerebral lateralization. *Acta Neuropathol* 112, 305–316. 10.1007/s00401-006-0090-8.
88. Busse, S., Busse, M., Schiltz, K., Bielau, H., Gos, T., Brisch, R., Mawrin, C., Schmitt, A., Jordan, W., Müller, U.J., et al. (2012). Different distribution patterns of lymphocytes and microglia in the hippocampus of patients with residual versus paranoid schizophrenia: further evidence for disease course-related immune alterations. *Brain Behav Immun* 26, 1273–1279. 10.1016/j.bbi.2012.08.005.
89. Missault, S., Van den Eynde, K., Vanden Berghe, W., Fransen, E., Weeren, A., Timmermans, J.P., Kumar-Singh, S., and Dedeurwaerdere, S. (2014). The risk for behavioural deficits is determined by the maternal immune response to prenatal immune challenge in a neurodevelopmental model. *Brain, Behavior, and Immunity* 42, 138–146. 10.1016/j.bbi.2014.06.013.
90. Corradini, I., Focchi, E., Rasile, M., Morini, R., Desiato, G., Tomasoni, R., Lizier, M., Ghirardini, E., Fesce, R., Morone, D., et al. (2018). Maternal Immune Activation Delays Excitatory-to-Inhibitory Gamma-Aminobutyric Acid Switch in Offspring. *Biological Psychiatry* 83, 680–691. 10.1016/j.biopsych.2017.09.030.
91. Giovanoli, S., Engler, H., Engler, A., Richetto, J., Voget, M., Willi, R., Winter, C., Riva, M.A., Mortensen, P.B., Feldon, J., et al. (2013). Stress in Puberty Unmasks Latent Neuropathological Consequences of Prenatal Immune Activation in Mice. *Science* 339, 1095–1099. 10.1126/science.1228261.
92. Giovanoli, S., Weber-Stadlbauer, U., Schedlowski, M., Meyer, U., and Engler, H. (2016). Prenatal immune activation causes hippocampal synaptic deficits in the absence of

overt microglia anomalies. *Brain, Behavior, and Immunity* 55, 25–38. 10.1016/j.bbi.2015.09.015.

93. Hayes, L.N., An, K., Carloni, E., Li, F., Vincent, E., Trippaers, C., Paranjpe, M., Dölen, G., Goff, L.A., Ramos, A., et al. (2022). Prenatal immune stress blunts microglia reactivity, impairing neurocircuitry. *Nature* 610, 327–334. 10.1038/s41586-022-05274-z.

94. Juckel, G., Manitz, M.P., Brüne, M., Friebe, A., Heneka, M.T., and Wolf, R.J. (2011). Microglial activation in a neuroinflammatory animal model of schizophrenia--a pilot study. *Schizophr Res* 131, 96–100. 10.1016/j.schres.2011.06.018.

95. Fernández-Arjona, M. del M., Grondona, J.M., Fernández-Llebregz, P., and López-Ávalos, M.D. (2019). Microglial Morphometric Parameters Correlate With the Expression Level of IL-1 β , and Allow Identifying Different Activated Morphotypes. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 472. 10.3389/fncel.2019.00472.

96. Sierra, A., Abiega, O., Shahraz, A., and Neumann, H. (2013). Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Front. Cell. Neurosci.* 7. 10.3389/fncel.2013.00006.

97. Taban, Q., Mumtaz, P.T., Masoodi, K.Z., Haq, E., and Ahmad, S.M. (2022). Scavenger receptors in host defense: from functional aspects to mode of action. *Cell Communication and Signaling* 20, 2. 10.1186/s12964-021-00812-0.

98. Kobayashi, K., Imagama, S., Ohgomori, T., Hirano, K., Uchimura, K., Sakamoto, K., Hirakawa, A., Takeuchi, H., Suzumura, A., Ishiguro, N., et al. (2013). Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis* 4, e525–e525. 10.1038/cddis.2013.54.

99. Litvinchuk, A., Wan, Y.-W., Swartzlander, D.B., Chen, F., Cole, A., Propson, N.E., Wang, Q., Zhang, B., Liu, Z., and Zheng, H. (2018). Complement C3aR Inactivation Attenuates Tau Pathology and Reverses an Immune Network Deregulated in Tauopathy Models and Alzheimer's Disease. *Neuron* 100, 1337-1353.e5. 10.1016/j.neuron.2018.10.031.

Figures

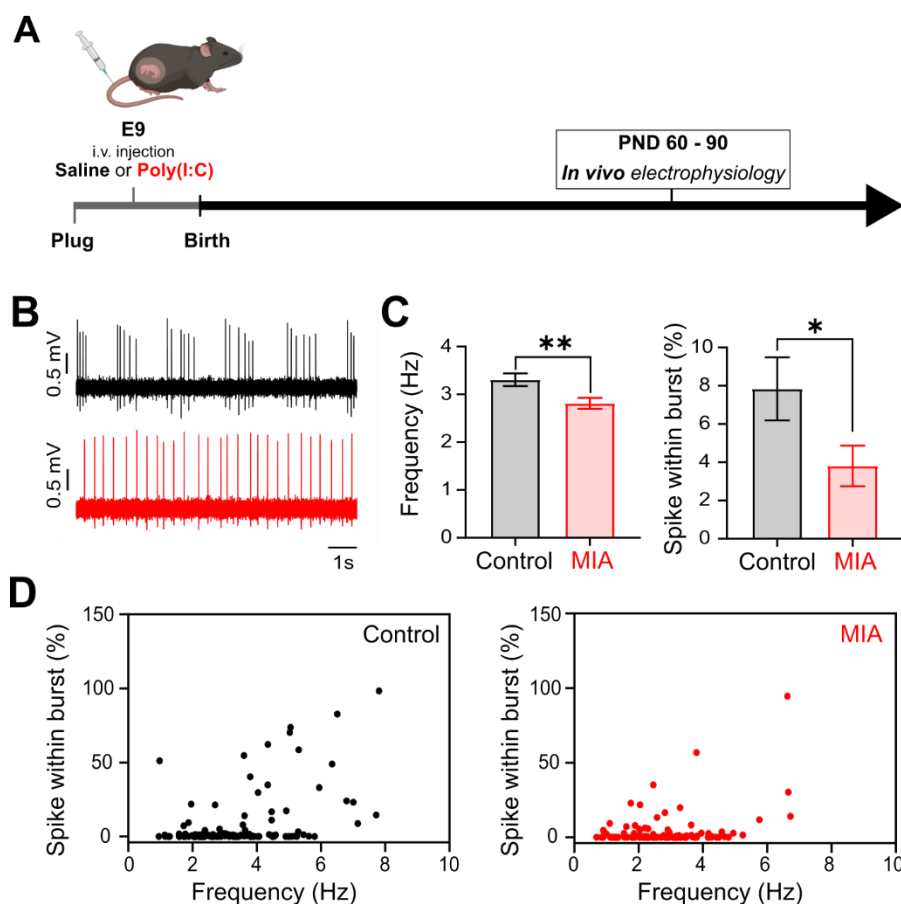


Figure 1. Prenatal maternal immune activation decreases the VTA DA neurons firing activity in adult mice *in vivo*.

(A) Experimental timeline. Pregnant dams received either vehicle (control) or Poly(I:C) (maternal immune activation (MIA) condition) injections at embryonic day 9 (E9). *In vivo* juxtacellular recordings were performed in the offspring between postnatal days 60 and 90 (P60-P90). (B) Sample spike trains of DA neurons recorded *in vivo* in the VTA of anesthetized mice. Top, burst firing in DA neurons from control offspring. Bottom, regular firing in DA neurons from MIA offspring. (C) Left, mean firing frequencies of VTA DA neurons in control (n = 126 cells from 9 mice) and MIA-exposed mice (n = 117 cells from 11 mice); Unpaired t test, ** p = 0.0052. Right, percentage of spikes detected within bursts; Unpaired t test, * p = 0.0444. (D) Burst-firing frequency plots for all recorded VTA DA neurons in control (left) and MIA mice (right).

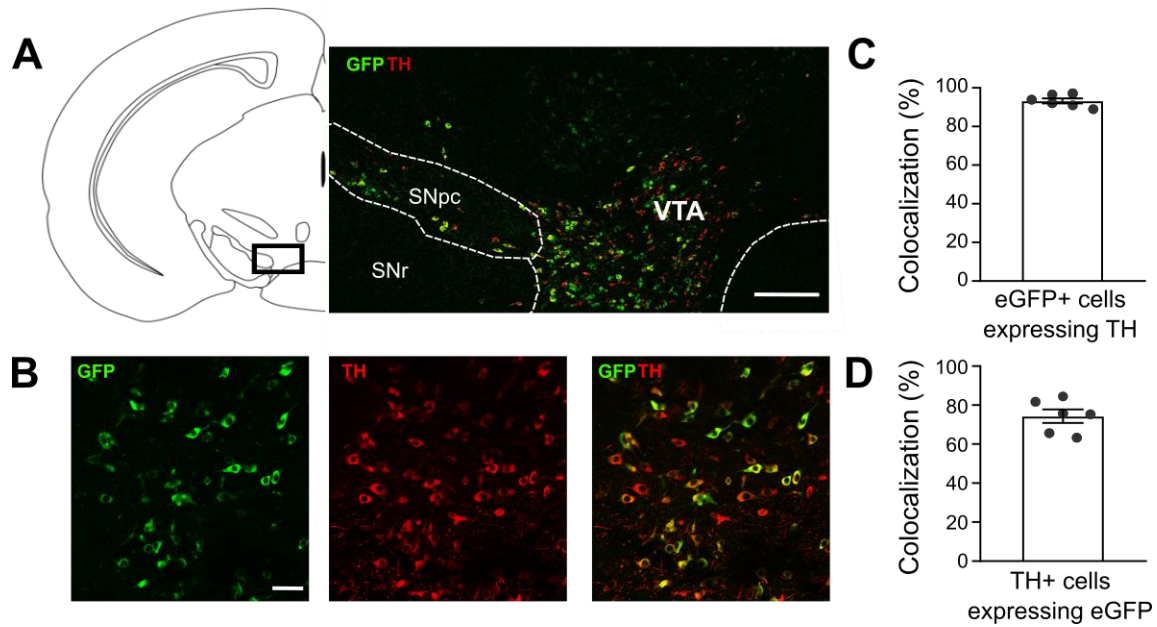


Figure 2. *Drd2-EGF-L10a* express eGFP in VTA DA neurons.

(A) Co-immunostaining of GFP (green) and tyrosine hydroxylase (TH, red) in the VTA of *Drd2-EGF-L10a* mice (scale bar: 200 μ m). SNc: substantia nigra *pars compacta*; SNr: substantia nigra *pars reticulata*. (B) Enlargement of the boxed area in (A) showing that the vast majority of eGFP+ (DRD2+) cells in the VTA are dopaminergic (TH+) cells (scale: 50 μ m) (C) Percentage of eGFP+ cells also expressing TH in the VTA of *Drd2-EGF-L10a* mice. (n = 6 mice) (D) Percentage of TH+ cells also expressing eGFP in the VTA of *Drd2-EGF-L10a* mice (n = 6 mice).

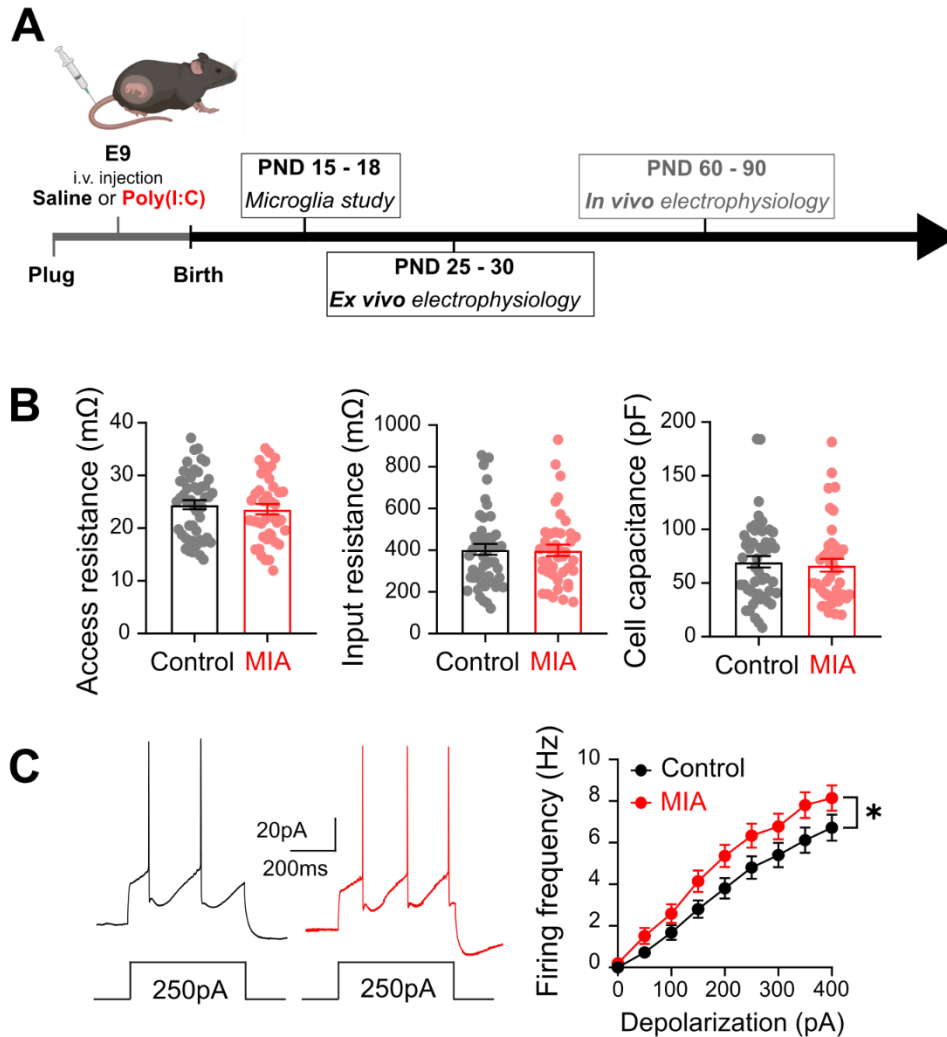


Figure 3. Increased intrinsic excitability in VTA D₂R-expressing neurons from MIA offspring.

(A) Experimental timeline. (B) Access resistance, input resistance and cell capacitance in eGFP⁺ cells in control (n = 50 cells from 9 mice) and MIA offspring (n = 41 cells from 9 mice). Data are presented as mean ± SEM. Each dot represents a single recorded cell. (B) Left, sample spike trains evoked by a 250 pA current injection recorded in D₂R-expressing neurons from control and MIA offspring. Right, F-I curve (mean ± SEM) of eGFP⁺ cells from control (n = 50 cells from 9 mice) and MIA offspring (n = 41 cells from 9 mice); two-way RM ANOVA, MIA effect, * $p = 0.045$.

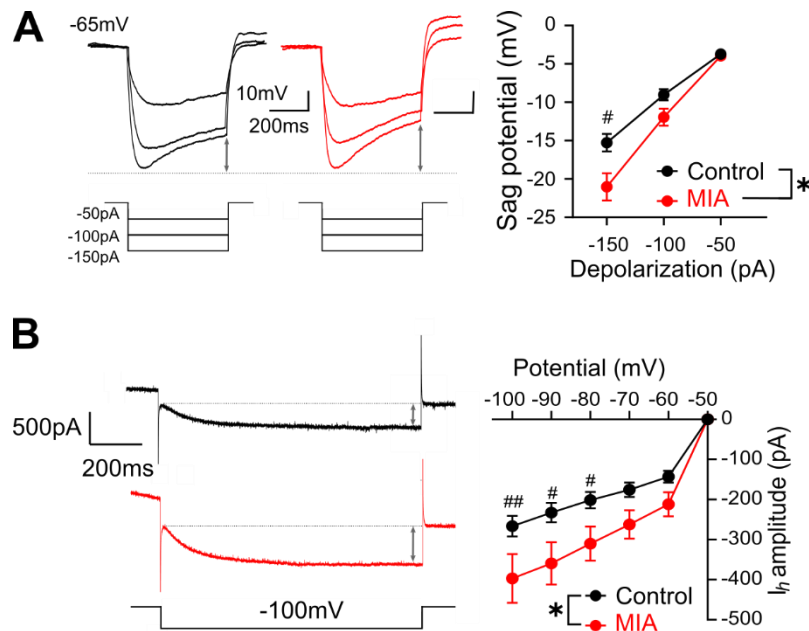


Figure 4. D₂R-expressing cells from MIA-exposed animals display an enlarged voltage sag reflecting increased HCN-mediated I_h currents.

(A) Left, example sag potentials induced by hyperpolarizing current step injections. Grey arrows indicate how the amplitude voltage was measured. Right, sag potential amplitude in response to consecutive hyperpolarizing-current injections (mean \pm SEM) in D₂R-expressing neurons from control (n = 48 cells from 9 mice) and MIA offspring (n = 37 from 9 mice); two-way RM ANOVA, group effect, * p = 0.019; Sidak's *post hoc* test, # p = 0.025. (B) Left, representative I_h currents recorded at a holding potential of -100mV in D₂R-expressing neurons from control (black) and MIA (red) offspring. Right, I_h current amplitude in response to hyperpolarizing voltage steps in neurons from control (n = 17 cells from 4 mice) and MIA offspring (n = 10 cells from 4 mice); two-way RM ANOVA, group effect, * p = 0.023; Sidak's *post hoc* test, # p < 0.05, ## p < 0.01. Grey arrows indicate how the I_h current was measured.

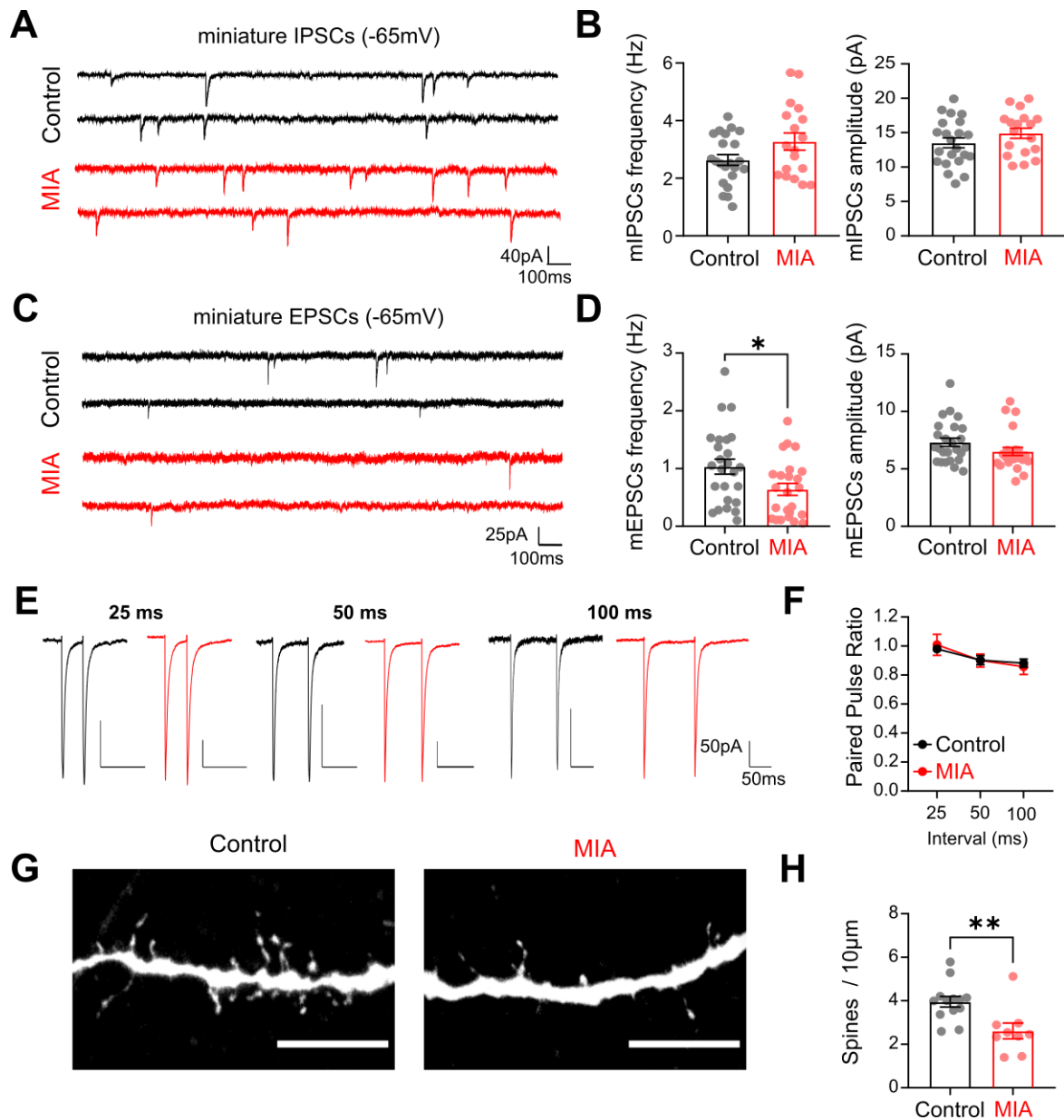


Figure 5. MIA does not alter inhibitory but decreases excitatory synaptic transmission in VTA D₂R-expressing neurons.

(A) Sample traces of miniature post-synaptic inhibitory currents (mIPSCs) from D₂R-expressing neurons in control (black) and MIA (red) offspring, recorded at -65mV using a high chloride intracellular solution. (B) Left, mean mIPSC frequency. Right, mean mIPSC amplitude in control (n = 22 from 7 mice) and MIA cells (n = 18 from 6 mice) groups; frequency: t-test, $p = 0.067$; amplitude: t-test, $p = 0.188$. Data are presented as mean \pm SEM. Each dot represents a single recorded cell. (C) Sample traces of miniature post-synaptic excitatory currents (mEPSCs) from D₂R-expressing neurons in control and MIA-exposed mice, recorded at -65mV. (D) Left, mean mEPSC frequency. Right, mean mEPSC amplitude.

Recordings performed in control (n = 25 from 12 mice) and MIA cells (n = 24 from 10 mice) groups; frequency: Mann-Whitney test, * $p = 0.021$; amplitude: Mann-Whitney test, $p = 0.067$. Data are shown as mean \pm SEM. Each dot represents a single recorded cell. (E) Average traces of excitatory post-synaptic currents (EPSCs) evoked by two consecutive stimulations at 25 ms, 50 ms and 100 ms inter-stimulus intervals recorded in VTA D₂R-expressing neurons from control (black) and MIA offspring (red). (F) Paired-pulse ratio in control (n = 24 from 5 mice) and MIA-exposed mice (n = 19 from 4 mice). (G) Maximal intensity projections of 3D confocal stacks of biocytin-filled primary dendrites of D₂R-expressing neurons from control (left) and MIA offspring (right), scale: 10 μ m. (H) Spine density histogram in control (n = 13 cells from 5 mice) and MIA-exposed mice (n = 9 cells from 5 mice); Mann-Whitney test, ** $p = 0.0026$. Data are presented as mean \pm SEM.

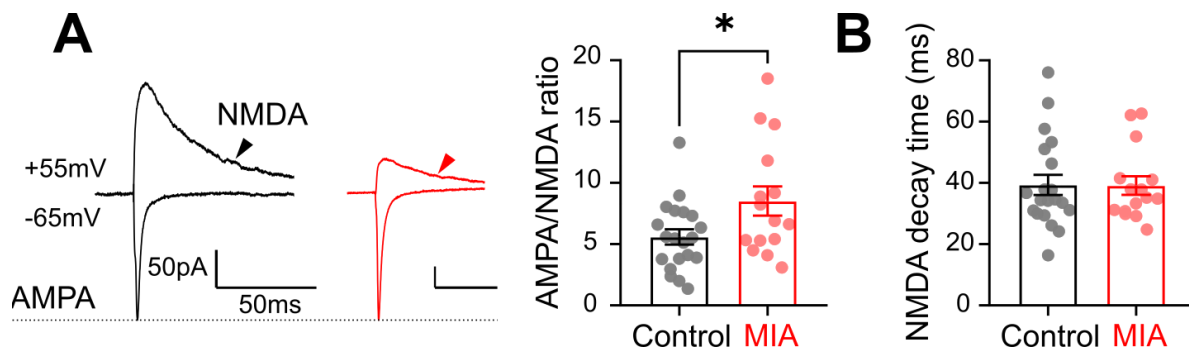


Figure 6. D₂R-expressing cells from MIA offspring display an increased AMPA / NMDA ratio.

(A) Left, sample traces of evoked AMPA (inward) and NMDA (outward) currents recorded at -65 mV and +55 mV, respectively. Arrowheads show how the I_{NMDA} was measured for computing the AMPA / NMDA ratio (50 ms after stimulation). Right, AMPA / NMDA ratio of D₂R-expressing neurons in control (n = 20 cells from 4 mice) and MIA offspring (n = 15 cells from 5 mice); Unpaired t test, * $p = 0.026$. (B) The NMDA decay time of I_{NMDA} recorded in D₂R-expressing neurons was unchanged in MIA offspring (control: n = 20 cells from 4 mice; MIA: n = 15 cells from 5 mice). Data are presented as mean \pm SEM. Each dot is an individual recorded neuron.

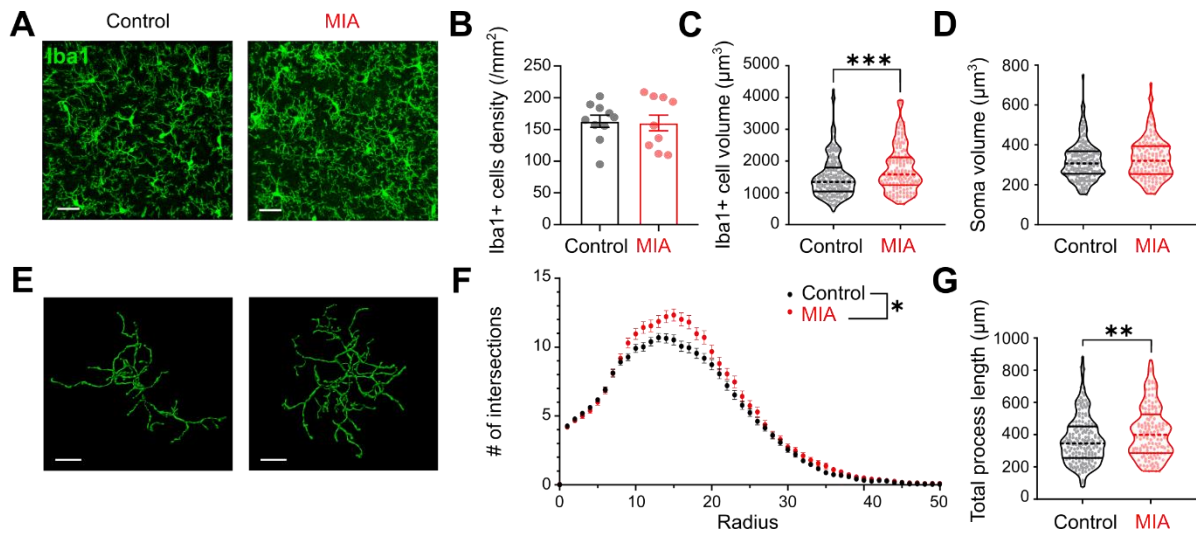


Figure 7. MIA does not affect VTA microglia density but increased microglial cells arborization in juvenile mice.

(A) Representative confocal z-projection of Iba1-stained microglial cells in the VTA of control and MIA offspring; scale bar: 30 μm . (B) In the VTA, Iba1-positive microglial cells density is not affected by prenatal immune activation. Data are presented as mean \pm SEM; Control: n = 10 mice; MIA: n = 9 mice. (C) Microglial cell volume (control: n = 182 cells from 11 mice; MIA: n = 142 cells from 8 mice; Mann-Whitney test, *** $p = 0.0005$) is increased after *in utero* exposure to MIA, (D) without changes of the soma volume. (E) Example reconstructions of Iba1+ microglial cells using the filament tracer plugin in Imaris software; scale bar: 10 μm . (F) Sholl profiles of VTA microglial cells from control and MIA offspring (radius: 2 μm ; control: n = 182 cells from 11 mice; MIA: n = 142 cells from 8 mice); note the increased arborization in the MIA group (two-way RM ANOVA, injection effect: $F_{(1,322)} = 5.722$, * $p = 0.0173$). (G) The increased volume of microglial cells is associated with an increased in the total length of microglial cells' processes; Mann-Whitney test, ** $p = 0.0064$.

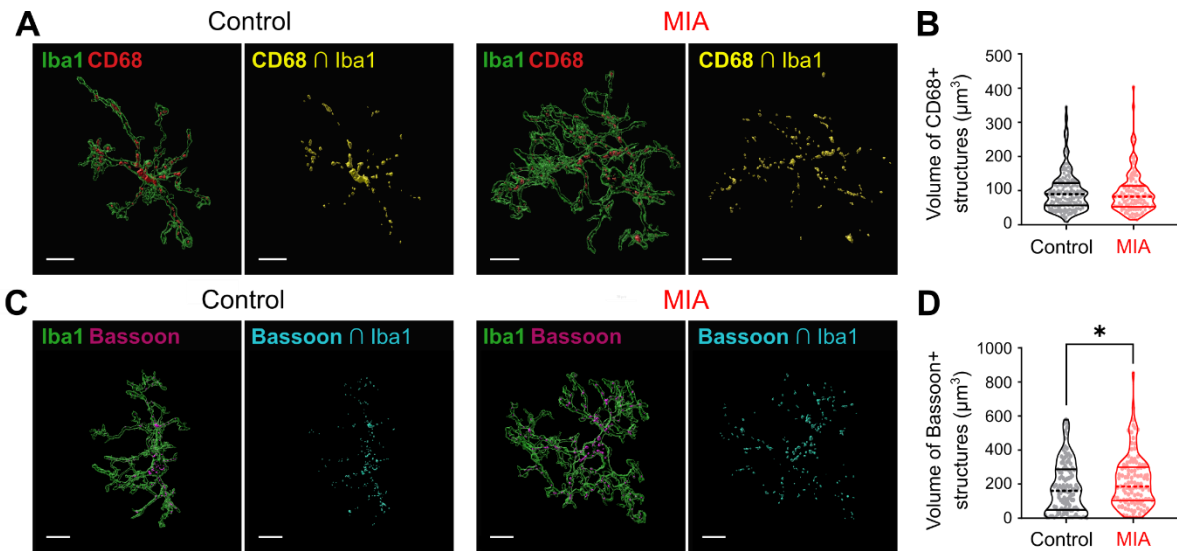


Figure 8. Increased engulfment of bassoon+ presynaptic material by microglial cells from MIA-exposed mice without changes of their CD68+ lysosomal content

(A) 3D reconstructions of confocal images of Iba1/CD68 co-immunostainings (scale: $10\mu\text{m}$). Left panels: Iba1+ microglial cells (green) and CD68+ lysosomes (red); Right panels: CD68+ lysosomes (yellow) from the microglia shown on the left panel (scale: $10\mu\text{m}$). (B) The volume of CD68+ structures within microglial cells is not affected by MIA. (C) 3D reconstructions of confocal images of Iba1/Bassoon co-immunostainings (scale: $10\mu\text{m}$). Left panels: Iba1+ microglial cells (green) and Bassoon (pink); Right panels: Bassoon+ presynaptic structures (cyan) engulfed by the microglia shown on the left panel. (D) Increased volume of Bassoon+ structures in microglial cells from MIA offspring (control: $n = 118$ cells from 11 mice; MIA: $n = 109$ cells from 9 mice; Mann-Whitney test, * $p = 0.047$).

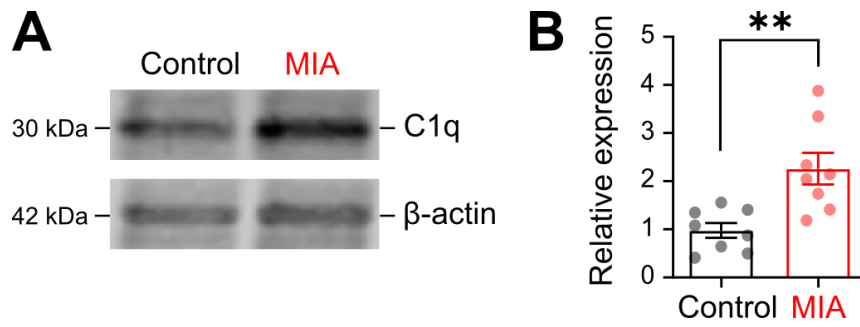


Figure 9. Increased C1q expression in the midbrain of MIA-exposed mice.

(A) Immunoblot analysis of C1q (top) and B-actin (bottom) expression in total homogenates from the midbrain of control and MIA offspring. (B) Quantification showing increased C1q expression in the midbrain of MIA offspring (n = 8 mice aged P30) compared to controls (n = 8 mice aged P30); Unpaired t test, ** $p = 0.0032$.

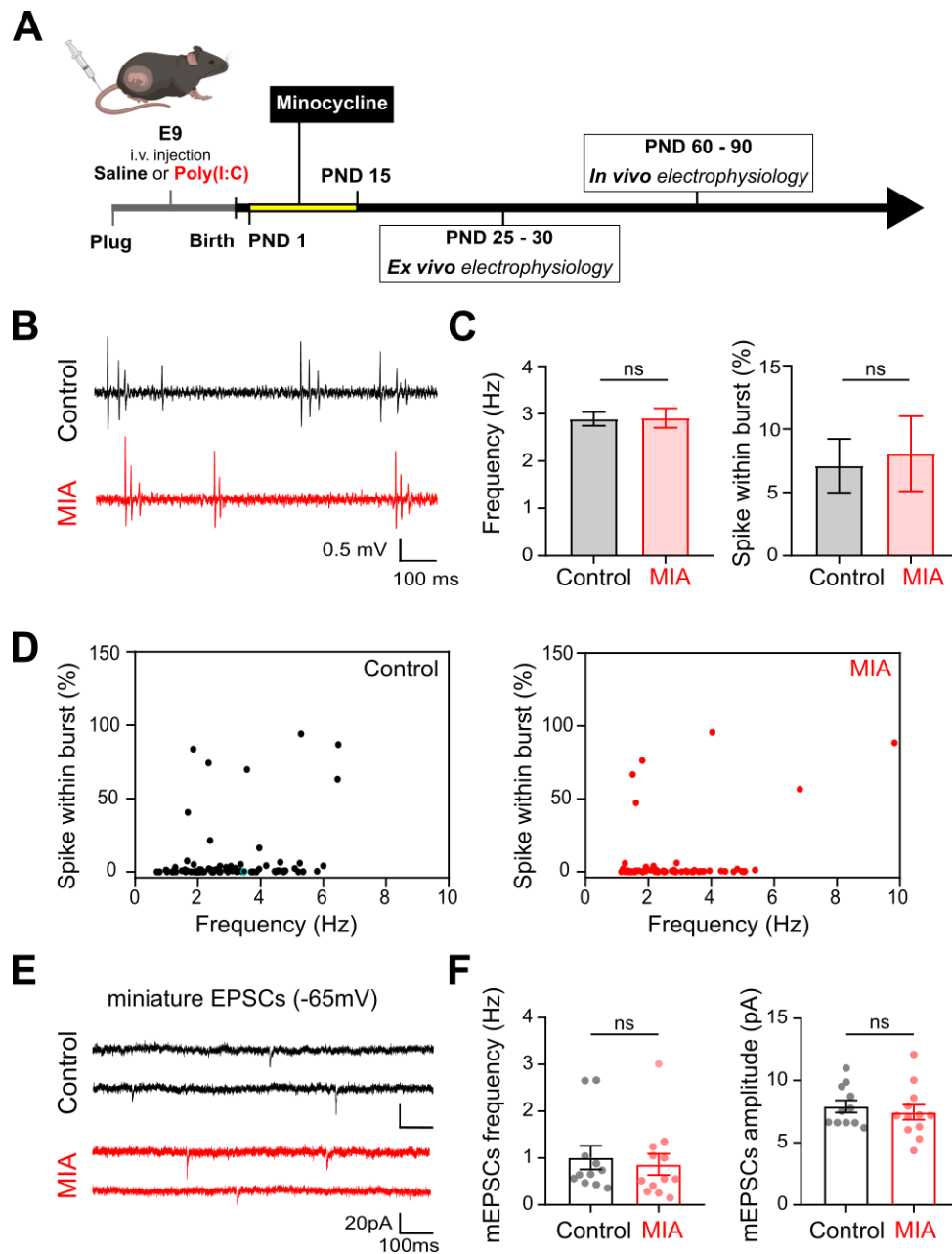


Figure 10. Minocycline treatment prevents the altered firing activity *in vivo* and the decreased excitatory synaptic transmission observed *ex vivo*.

(A) Experimental timeline. Minocycline (50 mg/kg) was added to the drinking water of the Poly(I:C)-exposed dam and passed on to the MIA offspring through lactation from P1 to P15. (B) Sample spike trains of DA neurons recorded *in vivo* in the VTA in control (top) and MIA offspring (bottom). (C) Left, mean firing frequencies of VTA DA neurons in control (n = 90 cells from 6 mice) and MIA-exposed mice (n = 58 cells from 6 mice). Right, percentage of spike detected within bursts in these recordings. (D) Burst – firing frequency plots for VTA DA neurons in minocycline-treated control (left) and MIA offspring (right). (E) Sample traces of miniature post-synaptic excitatory currents (mEPSCs) recorded at -65mV in D₂R-expressing

neurons from minocycline-treated control and MIA offspring. (F) Left, mean mEPSC frequency. Right, mean mEPSC amplitude. Recordings performed in control (n = 11 from 3 mice) and MIA offspring neurons (n = 12 cells from 3 mice); frequency: Mann-Whitney test, ns (not significant), p = 0.5550; amplitude: Unpaired t test, ns (not significant), p = 0.5567. Data are shown as mean \pm SEM. Each dot represents a single recorded cell.

Supplementary information

Table S1: Summary of key resources

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Experimental Models: Mouse strains		
C57Bl6/J	Janvier Labs	C57BL/6JRj
<i>Drd2-EGFP-L10a</i>	Institut du Fer à Moulin	
Antibodies and labelling		
Primary		
Chicken anti-tyrosine hydroxylase	Millipore	AB9702
Rabbit anti-GFP	Molecular Probes	A-6455
Rabbit anti-Iba1	Wako	019-19741
Rabbit anti-Iba1	Synaptic Systems	HS-234-013
Rat anti-CD68	Serotec BioRad	MCA1957
Mouse anti-Bassoon	Santa Cruz	sc58509
Rabbit anti-C1q	Abcam	ab182451
Rabbit anti-actine	Sigma	A2066
Biocytin	Hello Bio	HB5035
Secondary		
Donkey anti-chicken Alexa Fluor 647	Jackson ImmunoResearch	AB_2340379
Goat anti-rabbit Alexa Fluor 488	Life Technologies	A11034
Goat anti-rat Alexa Fluor 555	Life Technologies	A21434
Goat anti-mouse Alexa Fluor 647	Life Technologies	A21241
Cy3-conjugated Streptavidin	Invitrogen	S21381
Donkey anti-rabbit 800nm	LI-COR	926-32213
Donkey anti-chicken 800 nm	LI-COR	926-32218
Donkey anti-rabbit 680 nm	LI-COR	952-68073
Softwares and Algorithms		
GraphPad Prism	Dotmatics	https://www.graphpad.com/
Image J	Bitplane	http://www.bitplane.com/imaris
Imaris Studio	NIH	https://imagej.nih.gov/ij/

MiniAnalysis	SynptoSoft	N/A
NeuroMatic	WaveMetrics Igor Pro	http://www.neuromatic.thinkrandom.com/
PatchMaster	HEKA	http://www.heka.com/products/products_main.html#soft_pm

Table S2: Data summary

	Control	n	N	L	MIA	n	N	L	Test	p value	Significant t	F statistics (ANOVA)
In vivo juxtacellular recordings at 8-12weeks												
Firing frequency (Hz)	3.31 ± 0.13	126	10	4	2.81 ± 0.11	117	10	5	Unpaired t test	0.0052	**	
Spike within burst (%)	7.84 ± 1.65	126	10	4	3.81 ± 1.06	117	10	5	Unpaired t test	0.0444	*	
Intrinsic properties at P25-P30												
Access resistance (MΩ)	24.45 ± 0.87	50	9	5	23.59 ± 0.98	41	9	3	Unpaired t test	0.5133	ns	
Input resistance (MΩ)	404 ± 26.27	50	9	5	399.5 ± 27.43	41	9	3	Mann-Whitney test	0.9336	ns	
Cell capacitance (pF)	69.74 ± 5.36	50	9	5	66.63 ± 5.98	41	9	3	Mann-Whitney test	0.4339	ns	
Firing frequency (Hz)		50	9	5		41	9	3	Two-way RM ANOVA	Depolarization < 0.0001	****	F(2,265, 201.6) = 188.6
										Injection: 0.0479	*	F(1, 89) = 4.02
										Interaction: 0.1228	ns	F(8, 712) = 1.594
Sag potential (mV)		48	9	5		37	9	3	Two-way RM ANOVA	Depolarization < 0.0001	****	F(1.70, 97.08) = 252.8
										Injection: 0.0190	*	F(1, 83) = 5.725
										Interaction: 0.0001	***	F(2, 166) = 9.356
-50pA	-3.72 ± 0.34				-3.961 ± 0.60				Sidak's post-hoc test		ns	
-100pA	-9.03 ± 0.75				-11.939 ± 1.11				Sidak's post-hoc test		ns	
-150pA	-15.28 ± 1.14				-21.03 ± 1.78				Sidak's post-hoc test		#	
I _h current (pA)		17	4	2		10	4	1	Two-way RM ANOVA	Depolarization < 0.0001	****	F(5, 125) = 124.6
										Injection: 0.0226	*	F(1, 25) = 5.902
										Interaction: 0.0002	***	F(5, 125) = 5.284
-60mV	-143.29 ± 14.92				-212 ± 29.92				Sidak's post-hoc test	0.4414	ns	
-70mV	-175.53 ± 18.20				-262.1 ± 35.77				Sidak's post-hoc test	0.1900	ns	
-80mV	-201.59 ± 20.40				-310.2 ± 42.32				Sidak's post-hoc test	0.0486	#	
-90mV	-232.82 ± 24.41				-359.2 ± 53.30				Sidak's post-hoc test	0.0132	#	
-100mV	-266.65 ± 26.04				-396.8 ± 60.74				Sidak's post-hoc test	0.0098	##	
Synaptic transmission at P25-P30												
mIPSCs frequency (Hz)	2.63 ± 0.19	22	7	5	3.27 ± 0.30	18	6	5	Unpaired t test	0.0672	ns	

mIPSCs amplitude (pA)	13.52 ± 0.72	22	7	5	14.92 ± 0.74	18	6	5	Unpaired t test	0.1883	ns	
mEPSCs frequency (Hz)	1.03 ± 0.13	25	12	9	0.64 ± 0.10	24	10	7	Mann-Whitney test	0.0207	*	
mEPSCs amplitude (pA)	7.33 ± 0.37	25	12	9	6.52 ± 0.35	24	10	7	Mann-Whitney test	0.0669	ns	
Paired-pulse ratio		24	5	2		19	4	3	Two-way RM ANOVA	Depolarization < 0.0001	****	F (2, 82) = 13,74
										Injection: 0.9893	ns	F (1, 41) = 0,0001819
										Interaction: 0.5502	ns	F (2, 82) = 0,6018
AMPA / NMDA ratio	5.59 ± 0.63	20	4	2	8.52 ± 1.19	15	5	3	Unpaired t test	0.0259	*	
NMDA decay time (ms)	39.36 ± 3.30	20	4	2	39.15 ± 3.04	15	5	3	Mann-Whitney test	0.7798	ns	
Immunohistochemistry and imaging results												
%TH/GFP	74.36 ± 3.44		6									
%GFP/TH	93.25 ± 1.30		6									
Spine density (per 10µm)	3.95 ± 0.25	13	5		2.61 ± 0.36	9	5		Mann-Whitney test	0.0026	**	
Microglia study												
Cell density (/mm ²)	162.8 ± 9.68		10	4	160.5 ± 13.76		9	4	Unpaired t test	0.8921	ns	
3D Sholl Analysis		182	11	4		142	8	4	Two-way RM ANOVA	Radius < 0.0001	****	F (50, 16100) = 711.5
										Injection: 0.0173	*	F (1, 322) = 5.722
										Interaction < 0.0001	****	F (50, 16100) = 3.663
Iba1+ cell volume (µm ³)	1487 ± 47.50	182	11	6	1744 ± 60.62	142	8	4	Mann-Whitney test	0.0005	***	
Iba1+ cell soma volume (µm ³)	317.8 ± 6.99	182	11	6	330.3 ± 8.44	142	8	4	Mann-Whitney test	0.2253	ns	
Total process length (µm)	366.8 ± 10.86	182	11	6	416.8 ± 13.49	142	8	4	Mann-Whitney test	0.0064	**	
CD68 volume inside Iba1+ cells (µm ³)	97.78 ± 4.39	182	11	6	92.45 ± 4.88	149	8	4	Unpaired t test	0.8812	ns	
Bassoon volume inside Iba1+ cells (µm ³)	180.2 ± 13.71	118	11	6	216.9 ± 14.78	109	9	4	Mann-Whitney test	0.0470	*	
Western-blot												
Clq relative expression	0.98 ± 0.15		8	4	2.26 ± 0.33		8	3	Unpaired t test	0.0032	**	

+ minocycline

***In vivo* juxtacellular recordings at 8-12weeks**

Firing frequency (Hz)	2.89 ± 0.15	90	6	2	2.91 ± 0.21	58	6	2	Unpaired t test	0.9413	ns	
Spike within burst (%)	7.10 ± 2.12	90	6	2	8.05 ± 2.96	58	6	2	Unpaired t test	0.789	ns	
Synaptic transmission at P25-P30												
mEPSCs frequency (Hz)	1.01 ± 0.25	11	3	1	0.86 ± 0.23	12	3	1	Mann-Whitney test	0.5550	ns	
mEPSCs amplitude (pA)	7.91 ± 0.49	11	3	1	7.45 ± 0.60	12	3	1	Unpaired t test	0.5567	ns	

n refers to the number of cells, N refers to the number of mice, L refers to the number of litters (= injected mothers). All data are presented as mean ± SEM. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001; Sidak's test # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001, #### p < 0.0001.

Discussion générale

Dans le cadre de ce projet de thèse, j'ai étudié les conséquences de la MIA sur l'activité et la connectivité des neurones DA de la VTA, et sur les propriétés de la microglie dans la VTA.

En accord avec de précédentes études, nous avons montré que l'exposition *in utero* à une MIA diminue l'activité des neurones DA de la VTA *in vivo* et modifie en particulier leur mode de décharge de potentiels d'action. Bien que nos résultats montrent des changements de l'excitabilité intrinsèque des neurones DA de la VTA induits par la MIA, ces altérations reflètent vraisemblablement des réponses homéostatiques destinées à restaurer les niveaux de décharge des neurones DA, comme je l'ai exposé dans la discussion du manuscrit présentée plus haut. Nos résultats suggèrent que l'altération de l'activité et du mode de décharge *en burst* des neurones DA pourrait être la conséquence d'une perte sélective des entrées synaptiques excitatrices accompagnée d'une diminution spécifique de la transmission portée par les NMDA_R, en l'absence de modification de la transmission inhibitrice. Cette perte d'entrées synaptiques pourrait être causée par des altérations du raffinement synaptique par la microglie. L'administration de minocycline, une tétracycline altérant la réactivité microgliale, aux nouveau-nés issus d'une mère ayant reçu une injection de Poly(I:C) a permis d'empêcher la perte des entrées synaptiques et la perte d'activité des neurones DA, suggérant que la microglie pourrait être impliquée dans les phénotypes observés. Les cellules microgliales sont impliquées dans le raffinement synaptique au cours du développement. Dans la VTA de souris exposées à la MIA, nous avons observé des changements des propriétés de ces cellules. La complexité et la longueur de leurs prolongements cellulaires sont augmentées. Le volume de matériels présynaptiques qu'elles englobent est, lui aussi, augmenté. Enfin, puisque l'expression de la protéine du système du complément C1q est augmentée dans le mésencéphale des souris MIA, nous formulons l'hypothèse que la MIA altère l'activité et la connectivité des neurones DA de la VTA par le biais d'une altération du raffinement synaptique dépendant de la microglie et du complément.

1. Le modèle murin *Drd2-EGFP-L10a* : les cellules GFP+ forment-elles une sous-population de neurones dopaminergiques ?

Comme je l'ai évoqué dans l'introduction, la VTA est une structure comprenant des types cellulaires distincts. Il est estimé que 60 à 80% des neurones de la VTA sont des neurones DA (Ginhoux and Merad, 2011 ; Yamaguchi et al., 2007). Ces neurones présentent une grande diversité de profils d'expression protéique. Notamment, le D₂R est exprimé au sein des neurones DA de la VTA selon un gradient : une plus grande concentration de cellules exprimant D₂R (cellules D₂R+) est observée dans la partie latérale de la VTA (dans les noyaux PBP et PN) (Morales and Margolis, 2017). Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé le modèle murin transgénique *Drd2-EGFP-L10a* qui exprime la eGFP sous le contrôle du promoteur du gène *Drd2*, codant pour le récepteur D₂R, pour les expériences en patch-clamp *ex vivo*. Nous avons constaté que dans la VTA de ces souris, seules 74.4 ± 3.4 % des cellules exprimant la TH sont eGFP+.

Les neurones DA exprimant les D₂R forment-ils une population spécifique et homogène de cellules DA ?

Une étude a révélé qu'au sein des neurones DA du mésencéphale de la souris adulte, une partie des neurones ciblant le cortex préfrontal est dépourvue de D₂R somato-dendritiques fonctionnels et que l'expression des D₂R au sein des neurones ciblant le cortex est très faible (Lammel et al., 2008). Ainsi, selon ces travaux, D₂R est un marqueur moléculaire permettant l'identification d'une sous-population de neurones DA. Néanmoins, la proportion de neurones mésocorticaux exprimant D₂R n'est pas nulle (Lammel et al., 2008). Une étude ultérieure a montré que, chez le rat, la majorité des neurones DA projetant vers le NAcc ou le PFC médian sont inhibés en présence de quinpirole, un agoniste des D₂R, alors le quinpirole n'a aucun effet sur les neurones ciblant l'amygdale (Margolis et al., 2012). Enfin, il existe des neurones mésocortico-limbiques, dont l'axone cible plusieurs structures distinctes (Aransay et al., 2015). Ainsi, les neurones eGFP+ que nous avons enregistrés en patch-clamp semblent majoritairement cibler le système limbique (« neurones mésolimbiques ») mais nous ne pouvons pas exclure le fait que certains d'entre eux, dans une moindre mesure, ciblent le cortex. Des injections stéréotaxiques de marqueurs rétrogrades au sein des structures cibles (NAcc, PFC, Amygdale) chez les souris *Drd2-EGFP-L10a* permettraient d'étudier le pourcentage de

colocalisation entre le marqueur et la eGFP au sein de la VTA, et ainsi d'identifier les cibles (et leur proportion) des neurones DA de la VTA qui expriment le D₂R.

A l'inverse, $93.25 \pm 1.30\%$ des cellules eGFP⁺ dans la VTA des animaux *Drd2-EGFP-L10a* expriment également TH. Ce pourcentage, inférieur à 100%, pourrait simplement refléter un niveau d'expression de TH trop faible dans certains neurones DA pour être détecté dans les expériences d'immunohistochimie. Une seconde possibilité est que ces neurones ne soient pas DA. Au sein du PBP et du PN, 25% des cellules qui ne présentent pas d'immunoréactivité à la TH sont glutamatergiques (détection d'ARNm de VGlut2) (Yamaguchi et al., 2015). Au sein de la VTA chez le rat, certains neurones GABAergiques sont inhibés en présence d'agonistes des D₂R (Margolis et al., 2012). La proportion marginale de neurones apparemment dépourvus d'expression de TH au sein de la population de neurones eGFP⁺ pourrait induire une certaine variabilité dans les résultats d'électrophysiologie *ex vivo* mais est peu susceptible de modifier nos conclusions.

Ainsi, les neurones DA enregistrés *in vivo* et identifiés sur la base de leur décharge caractéristique ne sont pas identiques aux neurones exprimant D₂R enregistrés *ex vivo*, ces derniers ne constituant qu'une sous-population majoritaire de neurones DA. Des expériences supplémentaires de patch-clamp dans des neurones DA de la VTA n'exprimant pas la eGFP mais identifiés par injection de biocytine et marquage immunohistochimique *post-hoc* pour la TH seraient utiles pour déterminer si les effets de la MIA sont homogènes dans l'ensemble des neurones DA de la VTA.

2. Lien entre microglie et perte de synapses excitatrices fonctionnelles : excès d'élimination synaptique ou défaut de formation des synapses ?

La réactivité microgliale au sein du modèle MIA

Nos travaux ont révélé que la MIA modifie, au sein de la VTA de la progéniture, les propriétés morphologiques de la microglie dont les prolongements cellulaires sont plus complexes et plus longs. Ce profil morphologique est associé à un état « plus ramifié » qui est classiquement associé à une moindre réactivité de la microglie (Fernández-Arjona et al., 2017). De récents résultats de transcriptomique à haut débit (scRNA seq) montrent qu'une exposition *in utero* à une MIA induite par injection de Poly(I:C) à la femelle gestante au stade E9.5 « émousse » la réactivité des cellules microgliales (« *blunting* ») du cortex frontal et du

striatum chez des souris âgées de 8 à 10 semaines, les rendant moins réactives lors de l'exposition post-natale à un nouveau challenge immunitaire (ici, une injection de LPS) (Hayes et al., 2022). La morphologie plus ramifiée des cellules microgliales de la VTA que nous avons observées chez les souris MIA semble compatible avec ces résultats et pourraient refléter un état plus éloigné de l'état d'activation classique « M1 » des microglies. Néanmoins, bien que les états morphologiques des cellules microgliales soient corrélés avec leurs états fonctionnels (Stence et al., 2001), une étude morphologique ne permet pas à elle seule de caractériser les modifications de la fonction microgliale que la MIA peut engendrer. Il est intéressant de noter qu'en conditions physiologiques, plus de 90% des cellules microgliales du cortex présentent une forme ramifiée dite « de *surveillance* », alors que cette proportion n'est que de 65% au sein de l'hippocampe (Leyh et al., 2021). Ces différences pourraient refléter les différences transcriptomiques observées par Grabert et *al.* qui mettent en évidence une plus grande expression de gènes impliqués dans l'immuno-surveillance au sein de l'hippocampe (Grabert et al., 2016). Ainsi, une analyse transcriptomique se focalisant sur l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire, les processus de phagocytose, ainsi que la communication entre cellules neuronales et microgliales permettraient de mieux caractériser le phénotype microglial au sein de la VTA suite à une exposition prénatale au Poly(I:C). De plus, la morphologie plus ramifiée de la microglie de la VTA consécutive à une MIA pourrait permettre à la cellule d'augmenter ses contacts avec les cellules neuronales. Il serait également intéressant d'étudier si la proportion de cellules DA en contact avec des prolongements microgliaux augmente au sein de la VTA chez les souris ayant été exposées *in utero* à une MIA, et de mesurer *in vivo* la fréquence et la durée des contacts que la microglie forme avec les dendrites des neurones DA, grâce aux méthodes récentes d'imagerie biphotonique permettant l'accès aux structures sous-corticales (« GRIN lenses ») (Hughes et al., 2019 ; Meng et al., 2019).

La MIA affecte-t-elle la formation et la stabilisation des synapses excitatrices fonctionnelles des neurones DA de la VTA ?

Une limite de notre travail sur les propriétés de la microglie, partagée avec la plupart des études sur le sujet, est que nos résultats ont été obtenus à partir de tissu fixé. De ce fait, la dynamique des contacts microglie-neurones, et la dynamique de formation et d'élimination des synapses glutamatergiques (turnover des épines dendritiques notamment), n'ont pu être

caractérisées. Certaines de nos observations suggèrent une phagocytose microgliale exacerbée chez les souris MIA – notamment puisque nos résultats indiquent que la microglie engloutit davantage d'éléments présynaptiques (marquage anti-Bassoon). Les méthodes utilisées ne permettent cependant pas d'exclure que l'exposition *in utero* au Poly(I:C) puisse induire des altérations de formation et/ou de stabilisation des épines dendritiques. En effet, la microglie participe à la formation de synapses excitatrices et inhibitrices (Chen et al., 2016; Lim et al., 2013), et ses contacts avec les dendrites précèdent la formation de filopodes (Miyamoto et al., 2016). Des altérations microgliales dues à l'inflammation prénatale pourraient également perturber ces processus. Ainsi, l'exposition prénatale au Poly(I:C) décroît, chez la descendance, la formation et l'élimination des épines dendritiques dans les couches supérieures du cortex (Coiro et al., 2015). Au sein de l'équipe, des travaux ont permis de manière similaire de mettre en évidence par imagerie biphotonique *in vivo* que la surexpression de la protéine du complément C4 dans le cortex préfrontal, induite par électroporation *in utero*, cause une perte de synapses excitatrices fonctionnelles sur les cellules pyramidales ainsi qu'une diminution du turn-over synaptique incluant une diminution de la formation d'épines dendritiques (Druart et al., 2021). C4 est en aval de C1q dans le système du complément (Druart and Le Magueresse, 2019). Ici, nous avons pu observer que l'exposition prénatale à une MIA induit une augmentation de C1q dans le mésencéphale. Ainsi, il est possible que des mécanismes similaires opèrent dans les deux modèles (surexpression de C4 et MIA) et au sein de ces deux structures (cortex et VTA). Des expériences d'imagerie *in vivo* permettant d'étudier la formation et la disparition des épines dendritiques permettraient d'explorer plus finement la dynamique du turnover synaptique dans la VTA chez les souris MIA. Il est important de noter, dans ce contexte, qu'une perte apparente de formation et d'élimination des épines dendritiques corticale dans le modèle MIA n'est pas incompatible avec une phagocytose accrue par les microglies : il est possible que les synapses nouvellement formées ne soient pas stabilisées, étant plus rapidement phagocytées par la microglie. Quoiqu'il en soit, l'explication fréquente des diminutions de densité synaptique au cours du développement postnatal par une simple élimination des synapses surnuméraires par la microglie est sans doute trop simpliste, et ne tient pas compte des dynamiques complexes des interactions glie-neurones et des processus de formation-stabilisation-élimination des épines dendritiques.

Phagocytose et trogocytose

Il est généralement admis que la microglie engloutit des éléments neuronaux, y compris synaptiques, par phagocytose. Il s'agit d'un processus clé dans le développement des réseaux neuronaux et dans le maintien de leur intégrité (Paolicelli et al., 2011). Les molécules du système du complément participent à ce processus marquant les synapses à éliminer (signaux « *eat-me* ») (Stevens et al., 2007) et les récepteurs CR3 du complément portés par la microglie interviennent dans la suppression des synapses marquées (Schafer et al., 2012). De récents travaux ont révélé que la trogocytose, une forme de phagocytose spécialisée ou partielle, interviendrait dans le raffinement synaptique (Weinhard et al., 2018). Cette étude, en combinant de l'imagerie sur des cultures organotypiques (« *live-cell imaging* ») et de la microscopie électronique corrélée à de la microscopie optique (« *correlative light-electron microscopy* »), a révélé que la microglie engloutit des fractions cellulaires de petit volume (volume <0.5-1 μm) issus de sites pré-synaptiques ou d'axones. De façon intéressante, la trogocytose n'est pas compromise par le *knock-out* du récepteur au complément CR3.

Dans notre modèle MIA, l'élévation de l'expression de C1q dans le mésencéphale suggère l'implication du système du complément dans les phénotypes observés. Néanmoins, des expériences supplémentaires, utilisant notamment un modèle de souris *knock-out* pour le récepteur CR3 (CR3 KO), permettraient de confirmer l'hypothèse que la phagocytose, et non la trogocytose, est impliquée dans la perte de synapses excitatrices. Comme le récepteur CR3 n'est exprimé que par la microglie dans le cerveau, l'utilisation des souris CR3 KO permettrait aussi de prouver le rôle causal de la microglie dans les phénotypes étudiés.

3. Phénotypes différenciés au niveau des synapses excitatrices et inhibitrices dans le modèle MIA

Dans nos travaux, nous avons pu observer que la fréquence et l'amplitude des courants synaptiques inhibiteurs (mIPSCs) enregistrés au soma des cellules DA ne change pas chez les souris MIA alors que la fréquence des courants synaptiques excitateurs (mEPSCs) et la densité des épines dendritiques des neurones DA sont diminuées, ce qui pourrait, d'après nos résultats, être la conséquence d'une altération du raffinement synaptique par la microglie. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ces différences entre synapses inhibitrices et excitatrices.

Tout d'abord, les synapses excitatrices et inhibitrices diffèrent par leur composition moléculaire et le type de contacts qu'elles forment. Alors que la majorité des synapses excitatrices se font sur des épines dendritiques, les afférences inhibitrices contactent en majorité le soma et les filaments dendritiques (Boivin and Nedivi, 2018). Dans le cortex, la synaptogenèse glutamatergique et GABAergique ne font pas intervenir les mêmes molécules (Favuzzi and Rico, 2018). Puisque les synapses excitatrices et inhibitrices diffèrent par leur composition et structure, il est possible que les acteurs moléculaires et cellulaires impliqués dans leur raffinement soient eux aussi différents. Les mécanismes d'élagage synaptique dépendant de la microglie ont été particulièrement étudiés aux synapses glutamatergiques (Paolicelli et al., 2011 ; Schafer et al., 2012). Chez des souris adultes (8-12 semaines), une étude a démontré que la microglie est capable de défaire (« stripping synaptique ») des synapses inhibitrices GABAergiques formées sur le soma de cellules pyramidales suite à une injection intrapéritonéale de LPS par jour pendant quatre jours consécutifs (Chen et al., 2014), démontrant le rôle des cellules microgliales dans le raffinement des synapses inhibitrices, en réponse à une inflammation. Par ailleurs, des travaux ont démontré que la microglie est capable d'opérer un raffinement des synapses inhibitrices par un processus dépendant de la phosphatidylsérine (Park et al., 2021) mais indépendant de C1q (Chu et al., 2010). Ces résultats suggèrent qu'un raffinement dépendant de la microglie a également lieu aux synapses inhibitrices au cours du développement postnatal, mais qu'il est possible qu'il ne soit pas affecté par l'augmentation de l'expression de C1q consécutive à la MIA. De plus, les cellules microgliales sont pourvues de récepteurs au glutamate et au GABA (Fontainhas et al., 2011), suggérant qu'elles sont capables de sonder leur environnement et que leur activité dépend des signalisations excitatrices et inhibitrices environnantes. De façon intéressante, une étude récente a révélé l'existence de cellules microgliales sensibles au GABA au sein du cortex. Ces cellules microgliales expriment les récepteurs GABA_BR, desquels dépendent leurs interactions avec les synapses inhibitrices. La suppression de l'expression de ce récepteur par la microglie altère la densité des synapses inhibitrices sans affecter les synapses glutamatergiques (Favuzzi et al., 2021). Il n'existe à ce jour pas d'études comparables au sein de la VTA, mais ces résultats suggèrent que la présence de microglies spécialisées dans la détection des synapses GABAergiques est requise pour l'élimination et/ou la stabilisation sélective des synapses GABAergiques.

De plus, les interneurones GABAergiques présentent une grande hétérogénéité. Alors que dans le cortex et plus généralement dans le cerveau antérieur (« forebrain »), les sous-types

distincts d'interneurones font l'objet de plusieurs études, rares sont les travaux portant sur les sous-types d'interneurones GABAergiques de la VTA. Une étude récente a ainsi révélé la présence de trois sous-types d'interneurones GABAergiques à somatostatine (SST+) au sein de la VTA chez la souris, notamment identifiables par leurs propriétés électrophysiologiques (Nagaeva et al., 2020), et des interneurones GABAergiques à parvalbumine (PV+) ont également été observés au sein de la structure (Olson and Nestler, 2007). La caractérisation des sous-types d'interneurones présents dans la VTA permettrait sans doute de mieux comprendre l'effet de la MIA sur les synapses inhibitrices des neurones DA de la VTA. En effet, l'induction d'une MIA par injection de Poly(I:C) à la femelle gestante à E9 a des effets sur les synapses formées par les interneurones PV+ du cortex vers les cellules pyramidales avoisinantes, mais pas sur celles formées par les neurones SST+ (Canetta et al., 2016). Néanmoins, les afférences inhibitrices reçues par les neurones DA ne proviennent pas uniquement des interneurones GABAergiques de la VTA. Comme nous l'avons exposé dans l'introduction, elles proviennent également d'autres structures comme le BNST, le NAcc et le RMTg.

En conclusion, les conséquences différentes de la MIA aux synapses excitatrices et inhibitrices sur les neurones DA de la VTA pourraient s'expliquer par (1) les différences de structure et de composition moléculaires entre synapses excitatrices et inhibitrices, qui « recruterait » des types de microglies différentes pour leur stabilisation/élimination, et/ou l'absence dans la VTA de sous-types de microglie spécialisés dans la détection des synapses GABAergiques ; (2) la présence de certains types d'afférences GABAergiques spécifiques dans la VTA, qui seraient insensibles au raffinement synaptique dépendant du système du complément médié par les cellules microgliales, y compris celles pourvues de récepteurs GABA_BR.

4. Contribution des astrocytes aux phénotypes observés

Les astrocytes jouent un rôle complémentaire de celui de la microglie dans le raffinement synaptique postnatal. Les prolongements cellulaires des astrocytes entourent les synapses (sites pré- et post-synaptique), constituant ainsi la synapse tripartite (Araque et al., 1999). Comme les cellules microgliales, les astrocytes interviennent au cours du développement dans la formation, la stabilisation/maturation et l'élimination des synapses (Chung et al., 2015 ; Pfrieger and Barres, 1997 ; Ullian et al., 2001).

Rôle direct des astrocytes dans le raffinement synaptique

Les astrocytes expriment des gènes impliqués dans la phagocytose et le raffinement des synapses par phagocytose. Par exemple, ils expriment les récepteurs MERTK et MEGF10. Ces récepteurs permettent aux astrocytes de détecter et d'éliminer des synapses surnuméraires au sein du SNC en développement, selon un processus dépendant de l'activité et indépendant du système du complément. Les astrocytes sont capables de détecter l'externalisation de la phosphatidylsérine comme un signal d'élimination par le biais des signalisations induites par MERTK et MEGF10. L'engloutissement des synapses par les astrocytes est dépendant de l'activité neuronale mais indépendant de C1q (Chung et al., 2013). Néanmoins, en conditions pathologiques, il est possible que la signalisation médiée par C1q permette également aux astrocytes d'éliminer des synapses (excitatrices et inhibitrices). C'est notamment ce que révèle une récente étude portant sur des modèles murins de la maladie d'Alzheimer (Dejanovic et al., 2022).

Diaphonie astrocytes – microglie

De nombreuses observations démontrent que la perturbation de voies de signalisations astrocytaires influe sur la fonction des microglies, et vice-versa (« diaphonie »). Par les rôles complémentaires voire redondants qu'ils opèrent au sein du SNC en développement, ces deux types de cellules gliales interagissent, ensemble, pour le maintien de l'intégrité tissulaire. Cette interaction démarre dès les premiers stades de développement, lors de l'établissement et de la maturation des cellules gliales au sein du SNC. En effet, la microglie sécrète l'IL-1 β et l'IL-6 qui, respectivement, stimule la prolifération et promeut la différenciation des astrocytes (Giulian et al., 1988 ; Nakanishi et al., 2007). Certains résultats suggèrent que les astrocytes, à leur tour, pourraient permettre la différenciation développementale des cellules amiboïdes en cellules ramifiées (Kloss et al., 1997 ; Pont-Lezica et al., 2011 ; Tanaka et al., 1999 ; Tanaka and Maeda, 1996). En cas d'inflammation causée par l'application de LPS sur des tranches organotypiques, la coopération entre cellules microgliales et astrocytaires module l'activité neuronale : la microglie, activée par le LPS, recrute les astrocytes via la signalisation purinergique (ATP/P2Y1R) (Pascual et al., 2012). Par ailleurs, l'activité microgliale pourrait moduler la réactivité astrocytaire (Hayes et al., 2022). En effet, la MIA induite par injection de Poly(I:C) à la femelle gestante au stade embryonnaire E9.5 « émousse » les cellules

microgliales du cortex frontal et du striatum chez des souris âgées de 8 à 10 semaines. La microglie devient alors moins « réactive ». Cette étude révèle également un effet de la MIA sur les astrocytes. Ces derniers, contrairement aux cellules microgliales, présentent une augmentation de l'expression de cytokines inflammatoires (IL-6) dans le groupe MIA. Un traitement des mères gestantes avec un antagoniste du CSF-1_R (PLX5622), a permis de supprimer la microglie entre E9.5 et E12.5. Une fois le traitement arrêté, la microglie s'est renouvelée. Le renouvellement des cellules microgliales a normalisé les effets du MIA observés sur les astrocytes, démontrant que les changements astrocytaires sont causés par les modifications de la réactivité microgliale (Hayes et al., 2022). Les astrocytes pourraient ainsi avoir un rôle de compensation des altérations de la fonction microgliale (Traetta and Tremblay, 2022).

5. La minocycline dans le traitement des symptômes associés aux troubles neuropsychiatriques

Nos résultats montrent que les altérations de l'activité *in vivo* des neurones DA chez les souris MIA sont normalisées par un traitement post-natal à la minocycline. La minocycline est une tétracycline de seconde génération semi-synthétique qui passe la barrière hémato-encéphalique et a des effets anti-inflammatoires (Macdonald et al., 1973 ; Yong et al., 2004).

La minocycline a été utilisée dans de nombreuses études portant sur des modèles animaux de maladies neurodéveloppementales, psychiatriques ou neurodégénératives. Par exemple, des études sur modèles murins d'accidents ischémiques (Yrjänheikki et al., 1999) et de la maladie de Parkinson (Du et al., 2001) ont révélé son potentiel neuroprotecteur. Le traitement à la minocycline augmente l'espérance de vie des modèles murins de la maladie d'Huntington et de sclérose latérale amyotrophique (en anglais « *amyotrophic lateral sclerosis* », ALS) (Yong et al., 2004).

Le potentiel **anti-inflammatoire** de la minocycline pourrait notamment s'expliquer par le fait qu'elle diminue l'activité de l'isoforme inductible de l'oxyde nitrique synthase (en anglais « *inducible nitric oxide synthase* », iNOS) qui produit du monoxyde d'azote (NO), un médiateur de l'inflammation (Amin et al., 1996). De façon intéressante, l'exposition à une inflammation prénatale, induite par injection de Poly(I:C), semble avoir pour conséquence une augmentation de l'expression de iNOS dans différentes structures cérébrales (Carlezon et al., 2019; Eshhili et al., 2020). Dans le cerveau, la microglie et les astrocytes expriment iNOS et

sont une source de NO. De ce fait, la minocycline pourrait diminuer leur production de NO, et ainsi réduire leur activation et plus généralement, réduire la neuro-inflammation chronique (Yrjänheikki et al., 1999). La minocycline exerce aussi un effet **neuroprotecteur**. Elle réduit l'apoptose neuronale, un mécanisme commun de neurodégénérescence, et protège de l'excitotoxicité neuronale induite par le glutamate (Levkovitz et al., 2010 ; Miyaoka et al., 2012 ; Yong et al., 2004). L'inhibition de la réactivité microgliale par la minocycline semble bien établie, alors que les effets de la minocycline sur les astrocytes sont controversés (Tikka et al., 2001). Du fait de la diaphonie microglie-astrocyte, il est possible que l'action de la minocycline sur la microglie ait pour conséquence une modulation de la réactivité astrocytaire.

La minocycline a fait l'objet de plusieurs études cliniques afin d'évaluer son action dans le traitement des symptômes caractéristiques de certaines conditions neuropsychiatriques comme la schizophrénie ou les TSA. Certains résultats révèlent un potentiel de la minocycline dans la réduction des symptômes positifs et négatifs de la schizophrénie (Chaudhry et al., 2012; Levkovitz et al., 2010; Miyaoka et al., 2012; Sellgren et al., 2019). L'utilisation de la minocycline dans le traitement des symptômes associés aux TSA n'a pas permis de conclure à son efficacité (Pardo et al., 2013), mais est profitable aux patients atteints du syndrome de l'X fragile (Paribello et al., 2010). De plus, son utilisation dans des modèles génétiques de TSA a permis une réduction de certains comportements associés à l'autisme (Kumar and Sharma, 2016 ; Shigemori et al., 2015). Malgré des résultats prometteurs (Solmi et al., 2017), ces études souffrent du faible nombre de patients inclus (parfois, seulement une vingtaine) et de leur hétérogénéité. Notamment, plusieurs paramètres ne sont pas toujours pris en compte comme la médication prescrite (type et dose d'antipsychotiques), la latence depuis le diagnostic et l'âge des patients ; et d'autres mériteraient d'être envisagés comme l'historique (ou non) d'exposition à une MIA et les marqueurs de neuro-inflammation. Une telle stratification des cohortes de patients pourrait permettre d'identifier les populations de patients les plus à même de bénéficier d'un traitement à la minocycline.

Enfin, plusieurs preuves expérimentales suggèrent l'existence d'une période critique de reconfiguration des réseaux par la microglie, ce qui pourrait avoir des conséquences sur l'efficacité du traitement à la minocycline. La perte transitoire des cellules microgliales au sein du PFC induite par injection stéréotaxique de clodronate de disodium (acide clodronique ou « *clodronate disodium salt* » en anglais) chez des souris âgées de 6 semaines a révélé que l'absence de la microglie à l'adolescence est suffisante pour induire des défauts cognitifs chez la souris. Ces altérations cognitives sont associées à des altérations de la dynamique

d'engloutissement d'éléments synaptiques par la microglie, ainsi qu'à des défauts synaptiques des neurones pyramidaux du PFC chez la souris adulte. L'induction du même protocole de déplétion transitoire de la microglie chez des souris adultes (12 semaines) n'a pas les mêmes effets, ce qui démontre que le stade de développement auquel la microglie est supprimée détermine les altérations cérébrales ultérieures (Schalbetter et al., 2022). De la même manière, alors que l'inactivation du gène *Htr2b*, codant pour le récepteur à la sérotonine 5-HT_{2B}, au sein de la microglie dès la naissance affecte la sociabilité et la flexibilité comportementale de souris adultes, l'inactivation du récepteur microglial 5-HT_{2B} entre P28 et P30 n'a pas d'effet sur ces comportements (Albertini et al., 2022). Ensemble, ces deux études suggèrent que la modulation de l'activité microgliale, pour être bénéfique, doit intervenir à un stade précoce du développement cérébral. De même, dans un modèle d'interaction gène x environnement associée aux pathologies neurodéveloppementales (souris hétérozygotes pour le gène DISC-1 associé à la schizophrénie x MIA), la minocycline a des effets bénéfiques sur les phénotypes altérés (morphologie de la microglie, anomalie de la physiologie et de la structure neuronale) seulement si elle est administrée lors de la première semaine de vie post-natale (P1 à P8). Le traitement à la minocycline n'a pas d'effet s'il est administré entre P9 et P16 (Chini et al., 2020). Il est donc possible que dans le cadre de notre étude des conséquences d'une MIA sur le système DA, un traitement restreint à la première semaine post-natale suffise à induire les effets bénéfiques que nous observons avec une administration entre P1 et P16. A l'inverse, nous pouvons formuler l'hypothèse que l'effet d'un traitement plus tardif à la minocycline serait moindre.

Pour conclure, nos résultats montrent les conséquences d'une exposition prénatale au Poly(I:C) sur l'activité, l'excitabilité et la connectivité des neurones DA de la VTA et suggèrent que des altérations du raffinement de la connectivité excitatrice par la microglie et le complément au cours du développement postnatal précoce sont impliquées dans les effets à long terme de la MIA sur la décharge des neurones DA de la VTA. Ces résultats contribuent à identifier les mécanismes pathophysiologiques associés à certains troubles psychiatriques pour lesquelles la MIA est un facteur de risque, comme la schizophrénie et les TSA.

Bibliographie

Bibliographie

- Aarum J, Sandberg K, Haerberlein SLB, Persson MAA. 2003. Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proc Natl Acad Sci* **100**:15983–15988. doi:10.1073/pnas.2237050100
- Abeliovich A, Hammond R. 2007. Midbrain dopamine neuron differentiation: Factors and fates. *Dev Biol* **304**:447–454. doi:10.1016/j.ydbio.2007.01.032
- Aguilar-Valles A, Rodrigue B, Matta-Camacho E. 2020. Maternal Immune Activation and the Development of Dopaminergic Neurotransmission of the Offspring: Relevance for Schizophrenia and Other Psychoses. *Front Psychiatry* **11**:852. doi:10.3389/fpsy.2020.00852
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FMV. 2007. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* **10**:1538–1543. doi:10.1038/nn2014
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* **124**:783–801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015
- Albertini G, D'Andrea I, Druart M, Béchade C, Nieves-Rivera N, Etienne F, Le Magueresse C, Rebsam A, Heck N, Maroteaux L, Roumier A. 2022. Serotonin sensing by microglia conditions the proper development of neuronal circuits and of social and adaptive skills (preprint). *Neuroscience*. doi:10.1101/2022.03.09.483609
- Alfredsson G, Wiesel FA, Tylec A. 1988. Relationships between glutamate and monoamine metabolites in cerebrospinal fluid and serum in healthy volunteers. *Biol Psychiatry* **23**:689–697. doi:10.1016/0006-3223(88)90052-2
- Alliot F, Godin I, Pessac B. 1999. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Dev Brain Res* **117**:145–152. doi:10.1016/S0165-3806(99)00113-3
- Amin AR, Attur MG, Thakker GD, Patel PD, Vyas PR, Patel RN, Patel IR, Abramson SB. 1996. A novel mechanism of action of tetracyclines: Effects on nitric oxide synthases. *Proc Natl Acad Sci* **93**:14014–14019. doi:10.1073/pnas.93.24.14014
- Anastasiades PG, Boada C, Carter AG. 2019. Cell-Type-Specific D1 Dopamine Receptor Modulation of Projection Neurons and Interneurons in the Prefrontal Cortex. *Cereb Cortex N Y NY* **29**:3224–3242. doi:10.1093/cercor/bhy299
- Andersson E, Tryggvason U, Deng Q, Friling S, Alekseenko Z, Robert B, Perlmann T, Ericson J. 2006. Identification of Intrinsic Determinants of Midbrain Dopamine Neurons. *Cell* **124**:393–405. doi:10.1016/j.cell.2005.10.037
- Antony JM, Paquin A, Nutt SL, Kaplan DR, Miller FD. 2011. Endogenous microglia regulate development of embryonic cortical precursor cells. *J Neurosci Res* **89**:286–298. doi:10.1002/jnr.22533

- Aransay A, Rodríguez-López C, García-Amado M, Clascá F, Prensa L. 2015. Long-range projection neurons of the mouse ventral tegmental area: a single-cell axon tracing analysis. *Front Neuroanat* **9**. doi:10.3389/fnana.2015.00059
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* **22**:208–215. doi:10.1016/S0166-2236(98)01349-6
- Arias-Carrión O, Stamelou M, Murillo-Rodríguez E, Menéndez-González M, Pöppel E. 2010. Dopaminergic reward system: a short integrative review. *Int Arch Med* **3**:24. doi:10.1186/1755-7682-3-24
- Arnò B, Grassivaro F, Rossi C, Bergamaschi A, Castiglioni V, Furlan R, Greter M, Favaro R, Comi G, Becher B, Martino G, Muzio L. 2014. Neural progenitor cells orchestrate microglia migration and positioning into the developing cortex. *Nat Commun* **5**:5611. doi:10.1038/ncomms6611
- Ásgrímsdóttir ES, Arenas E. 2020. Midbrain Dopaminergic Neuron Development at the Single Cell Level: In vivo and in Stem Cells. *Front Cell Dev Biol* **8**:463. doi:10.3389/fcell.2020.00463
- Ashwell K. 1991. The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Dev Brain Res* **58**:1–12. doi:10.1016/0165-3806(91)90231-7
- Aubert I, Brana C, Pellevoisin C, Giros B, Caille I, Carles D, Vital C, Bloch B. 1997. Molecular anatomy of the development of the human substantia nigra. *J Comp Neurol* **379**:72–87. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19970303)379:1<72::AID-CNE5>3.0.CO;2-F
- Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E, Rutter M. 1995. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med* **25**:63–77. doi:10.1017/S0033291700028099
- Balcita-Pedicino JJ, Omelchenko N, Bell R, Sesack SR. 2011. The Inhibitory Influence of the Lateral Habenula on Midbrain Dopamine Cells: Ultrastructural Evidence for Indirect Mediation via the Rostromedial Mesopontine Tegmental Nucleus. *J Comp Neurol* **519**:1143–1164. doi:10.1002/cne.22561
- Barca C, Foray C, Hermann S, Herrlinger U, Remory I, Laoui D, Schäfers M, Grauer OM, Zinnhardt B, Jacobs AH. 2021. The Colony Stimulating Factor-1 Receptor (CSF-1R)-Mediated Regulation of Microglia/Macrophages as a Target for Neurological Disorders (Glioma, Stroke). *Front Immunol* **12**:787307. doi:10.3389/fimmu.2021.787307
- Bariselli S, Glangetas C, Tzanoulinou S, Bellone C. 2016. Ventral tegmental area subcircuits process rewarding and aversive experiences. *J Neurochem* **139**:1071–1080. doi:10.1111/jnc.13779
- Barko K, Shelton M, Xue X, Afriyie-Agyemang Y, Puig S, Freyberg Z, Tseng GC, Logan RW, Seney ML. 2022. Brain region- and sex-specific transcriptional profiles of microglia. *Front Psychiatry* **13**:945548. doi:10.3389/fpsyt.2022.945548

- Bastrikova N, Gardner GA, Reece JM, Jeromin A, Dudek SM. 2008. Synapse elimination accompanies functional plasticity in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci* **105**:3123–3127. doi:10.1073/pnas.0800027105
- Bayer Shirley A, Wills Katherine V, Triarhou Lazaros C, Ghetti B. 1995. Time of neuron origin and gradients of neurogenesis in midbrain dopaminergic neurons in the mouse. *Exp Brain Res* **105**. doi:10.1007/BF00240955
- Bear MF, Kleinschmidt A, Gu Q, Singer W. 1990. Disruption of Experience-Dependent Synaptic Modifications in Striate Cortex by Infusion of an NMDA Receptor Antagonist. *J Neurosci* **3**:909–925.
- Beaulieu J-M, Gainetdinov RR. 2011. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacol Rev* **63**:182–217. doi:10.1124/pr.110.002642
- Beck K, Hindley G, Borgan F, Ginestet C, McCutcheon R, Brugger S, Driesen N, Ranganathan M, D'Souza DC, Taylor M, Krystal JH, Howes OD. 2020. Association of Ketamine With Psychiatric Symptoms and Implications for Its Therapeutic Use and for Understanding Schizophrenia. *JAMA Netw Open* **3**:e204693. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.4693
- Beers DR, Henkel JS, Xiao Q, Zhao W, Wang J, Yen AA, Siklos L, McKercher SR, Appel SH. 2006. Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci* **103**:16021–16026. doi:10.1073/pnas.0607423103
- Beier KT, Steinberg EE, DeLoach KE, Xie S, Miyamichi K, Schwarz L, Gao XJ, Kremer EJ, Malenka RC, Luo L. 2015. Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input-Output Mapping. *Cell* **162**:622–634. doi:10.1016/j.cell.2015.07.015
- Bennett ML, Bennett C, Liddel SA, Ajami B, Zamaniana JL, Fernhoff NB, Mulinyawe SB, Bohlen CJ, Adil A, Tucker A, Weissman IL, Chang EF, Li G, Grant GA, Hayden Gephart MG, Barres BA. 2016. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *PNAS En Ligne*. doi:10.1073/pnas.1525528113
- Ben-Zvi A, Lacoste B, Kur E, Andreone BJ, Mayshar Y, Yan H, Gu C. 2014. Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood–brain barrier. *Nature* **509**:507–511. doi:10.1038/nature13324
- Biber K, Laurie DJ, Berthele A, Sommer B, Tölle TR, Gebicke-Härter P-J, Van Calcar D, Boddeke HWGM. 1999. Expression and Signaling of Group I Metabotropic Glutamate Receptors in Astrocytes and Microglia. *J Neurochem* **72**:1671–1680. doi:10.1046/j.1471-4159.1999.721671.x
- Bisht K, Okojie KA, Sharma K, Lentferink DH, Sun Y-Y, Chen H-R, Uweru JO, Amancherla S, Calcuttawala Z, Campos-Salazar AB, Corliss B, Jabbour L, Benderoth J, Friestad B, Mills WA, Isakson BE, Tremblay M-È, Kuan C-Y, Eyo UB. 2021. Capillary-associated microglia regulate vascular structure and function through PANX1-P2RY12 coupling in mice. *Nat Commun* **12**:5289. doi:10.1038/s41467-021-25590-8

- Bissonette GB, Roesch MR. 2016. Development and function of the midbrain dopamine system: what we know and what we need to: Development and function of the dopamine system. *Genes Brain Behav* **15**:62–73. doi:10.1111/gbb.12257
- Blanchette M, Daneman R. 2015. Formation and maintenance of the BBB. *Mech Dev* **138**:8–16. doi:10.1016/j.mod.2015.07.007
- Blinzinger K, Kreutzberg G. 1968. Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z Für Zellforsch Mikrosk Anat* **85**:145–157. doi:10.1007/BF00325030
- Blomström Å, Karlsson H, Gardner R, Jörgensen L, Magnusson C, Dalman C. 2015. Associations Between Maternal Infection During Pregnancy, Childhood Infections and the Risk of Subsequent Psychotic Disorder—A Swedish Cohort Study of Nearly 2 Million Individuals. *Schizophr Bull* sbv112. doi:10.1093/schbul/sbv112
- Bocklisch C, Pascoli V, Wong JCY, House DRC, Yvon C, de Roo M, Tan KR, Lüscher C. 2013. Cocaine Disinhibits Dopamine Neurons by Potentiation of GABA Transmission in the Ventral Tegmental Area. *Science* **341**:1521–1525. doi:10.1126/science.1237059
- Boivin JR, Nedivi E. 2018. Functional implications of inhibitory synapse placement on signal processing in pyramidal neuron dendrites. *Curr Opin Neurobiol* **51**:16–22. doi:10.1016/j.conb.2018.01.013
- Bond AM, Bhalala OG, Kessler JA. 2012. The dynamic role of bone morphogenetic proteins in neural stem cell fate and maturation. *Dev Neurobiol* **72**:1068–1084. doi:10.1002/dneu.22022
- Boucsein C, Zacharias R, Färber K, Pavlovic S, Hanisch U-K, Kettenmann H. 2003. Purinergic receptors on microglial cells: functional expression in acute brain slices and modulation of microglial activation in vitro. *Eur J Neurosci* **17**:2267–2276. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02663.x
- Bowler AE, Torrey EF. 1990. Influenza and Schizophrenia: Helsinki vs Edinburgh. *Arch Gen Psychiatry* **47**:876–877. doi:10.1001/archpsyc.1990.01810210084014
- Boyson J, Molinoff B. 1986. Quantitative Autoradiographic Localization of the D₁ and D₂ Subtypes of Dopamine Receptors in Rat Brain. *J Neurosci* **6**.
- Brioschi S, Zhou Y, Colonna M. 2020. Brain Parenchymal and Extraparenchymal Macrophages in Development, Homeostasis, and Disease. *J Immunol* **204**:294–305. doi:10.4049/jimmunol.1900821
- Bromberg-Martin ES, Matsumoto M, Hikosaka O. 2010. Dopamine in Motivational Control: Rewarding, Aversive, and Alerting. *Neuron* **68**:815–834. doi:10.1016/j.neuron.2010.11.022
- Brown AS. 2006. Prenatal Infection as a Risk Factor for Schizophrenia. *Schizophr Bull* **32**:200–202. doi:10.1093/schbul/sbj052

- Brown AS, Begg MD, Gravenstein S, Schaefer CA, Wyatt RJ, Bresnahan M, Babulas VP, Susser ES. 2004. Serologic Evidence of Prenatal Influenza in the Etiology of Schizophrenia. *ARCH GEN PSYCHIATRY* **61**.
- Brown AS, Cohen P, Greenwald S, Susser ES. 2000. Nonaffective Psychosis After Prenatal Exposure to Rubella. *Am J Psychiatry* **157**:438–443. doi:10.1176/appi.ajp.157.3.438
- Brown AS, Cohen P, Harkavy-Friedman J, Babulas V, Malaspina D, Gorman JM, Susser ES. 2001. Prenatal rubella, premorbid abnormalities, and adult schizophrenia. *Biol Psychiatry* **49**:473–486. doi:10.1016/S0006-3223(01)01068-X
- Brown AS, Derkits EJ. 2010. Prenatal Infection and Schizophrenia: A Review of Epidemiologic and Translational Studies. *Am J Psychiatry* **167**:261–280. doi:10.1176/appi.ajp.2009.09030361
- Brown AS, Schaefer CA, Quesenberry CP, Liu L, Babulas VP, Susser ES. 2005. Maternal Exposure to Toxoplasmosis and Risk of Schizophrenia in Adult Offspring. *Am J Psychiatry* **162**:767–773. doi:10.1176/appi.ajp.162.4.767
- Brozoski TJ, Brown RM, Rosvold HE, Goldman PS. 1979. Cognitive Deficit Caused by Regional Depletion of Dopamine in Prefrontal Cortex of Rhesus Monkey. *Sci New Ser* **205**:929–932.
- Bruttger J, Karram K, Wörtge S, Regen T, Marini F, Hoppmann N, Klein M, Blank T, Yona S, Wolf Y, Mack M, Pinteaux E, Müller W, Zipp F, Binder H, Bopp T, Prinz M, Jung S, Waisman A. 2015. Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity* **43**:92–106. doi:10.1016/j.immuni.2015.06.012
- Budgett RF, Bakker G, Sergeev E, Bennett KA, Bradley SJ. 2022. Targeting the Type 5 Metabotropic Glutamate Receptor: A Potential Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases? *Front Pharmacol* **13**:893422. doi:10.3389/fphar.2022.893422
- Buka SL, Cannon TD, Torrey EF, Yolken RH. 2008. Maternal Exposure to Herpes Simplex Virus and Risk of Psychosis Among Adult Offspring. *Biol Psychiatry* **63**:809–815. doi:10.1016/j.biopsych.2007.09.022
- Buka SL, Tsuang MT, Torrey EF, Klebanoff MA, Bernstein D, Yolken RH. 2001. Maternal Infections and Subsequent Psychosis Among Offspring. *Arch Gen Psychiatry* **58**:1032–1037. doi:10.1001/archpsyc.58.11.1032
- Cai J, Tong Q. 2022. Anatomy and Function of Ventral Tegmental Area Glutamate Neurons. *Front Neural Circuits* **16**:867053. doi:10.3389/fncir.2022.867053
- Calipari ES, Ferris MJ. 2013. Amphetamine Mechanisms and Actions at the Dopamine Terminal Revisited. *J Neurosci* **33**:8923–8925. doi:10.1523/JNEUROSCI.1033-13.2013
- Canetta S, Bolkan S, Padilla-Coreano N, Song LJ, Sahn R, Harrison NL, Gordon JA, Brown A, Kellendonk C. 2016. Maternal immune activation leads to selective functional deficits

- in offspring parvalbumin interneurons. *Mol Psychiatry* **21**:956–968. doi:10.1038/mp.2015.222
- Cardno AG, Gottesman II. 2000. Twin studies of schizophrenia: From bow-and-arrow concordances to Star Wars Mx and functional genomics. *Am J Med Genet* **97**:12–17. doi:10.1002/(SICI)1096-8628(200021)97:1<12::AID-AJMG3>3.0.CO;2-U
- Cardona AE, Piro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, Lee J-C, Cook DN, Jung S, Lira SA, Littman DR, Ransohoff RM. 2006. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci* **9**:917–924. doi:10.1038/nn1715
- Carlezon WA, Kim W, Missig G, Finger BC, Landino SM, Alexander AJ, Mokler EL, Robbins JO, Li Y, Bolshakov VY, McDougale CJ, Kim K-S. 2019. Maternal and early postnatal immune activation produce sex-specific effects on autism-like behaviors and neuroimmune function in mice. *Sci Rep* **9**:16928. doi:10.1038/s41598-019-53294-z
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T. 1957. On the presence of 3-hydroxytyramine in the brain. *Nature* **180**:471.
- Carlsson ML. 1998. Hypothesis: Is infantile autism a hypoglutamatergic disorder? Relevance of glutamate – serotonin interactions for pharmacotherapy. *J Neural Transm* **105**:525. doi:10.1007/s007020050076
- Carpentier PA, Palmer TD. 2009. Immune Influence on Adult Neural Stem Cell Regulation and Function. *Neuron* **64**:79–92. doi:10.1016/j.neuron.2009.08.038
- Carr DB, Sesack SR. 2000. Projections from the Rat Prefrontal Cortex to the Ventral Tegmental Area: Target Specificity in the Synaptic Associations with Mesoaccumbens and Mesocortical Neurons. *J Neurosci* **20**:3864–3873. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-10-03864.2000
- Catts VS, Derminio DS, Hahn C-G, Weickert CS. 2015. Postsynaptic density levels of the NMDA receptor NR1 subunit and PSD-95 protein in prefrontal cortex from people with schizophrenia. *Npj Schizophr* **1**:15037. doi:10.1038/npjshz.2015.37
- Chamak B, Morandi V, Mallat M. 1994. Brain macrophages stimulate neurite growth and regeneration by secreting thrombospondin. *J Neurosci Res* **38**:221–233. doi:10.1002/jnr.490380213
- Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. 2007. The origin and cell lineage of microglia—New concepts. *Brain Res Rev* **53**:344–354. doi:10.1016/j.brainresrev.2006.11.002
- Chang AJ, Wang L, Lucantonio F, Adams M, Lemire AL, Dudman JT, Cohen JY. 2021. Neuron-type specificity of dorsal raphe projections to ventral tegmental area (preprint). Neuroscience. doi:10.1101/2021.01.06.425641
- Chaudhry IB, Hallak J, Husain N, Minhas F, Stirling J, Richardson P, Dursun S, Dunn G, Deakin B. 2012. Minocycline benefits negative symptoms in early schizophrenia: a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial in patients on standard

- treatment. *J Psychopharmacol Oxf Engl* **26**:1185–1193. doi:10.1177/0269881112444941
- Checchin D, Sennlaub F, Levavasseur E, Leduc M, Chemtob S. 2006. Potential Role of Microglia in Retinal Blood Vessel Formation. *Investig Ophthalmology Vis Sci* **47**:3595. doi:10.1167/iops.05-1522
- Chen BT, Moran KA, Avshalumov MV, Rice ME. 2006. Limited regulation of somatodendritic dopamine release by voltage-sensitive Ca²⁺ channels contrasted with strong regulation of axonal dopamine release. *J Neurochem* **96**:645–655. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03519.x
- Chen BT, Patel JC, Moran KA, Rice ME. 2011. Differential calcium dependence of axonal versus somatodendritic dopamine release, with characteristics of both in the ventral tegmental area. *Front Syst Neurosci* **5**:4.
- Chen H, Lin W, Zhang Y, Lin L, Chen J, Zeng Y, Zheng M, Zhuang Z, Du H, Chen R, Liu N. 2016. IL-10 Promotes Neurite Outgrowth and Synapse Formation in Cultured Cortical Neurons after the Oxygen-Glucose Deprivation via JAK1/STAT3 Pathway. *Sci Rep* **6**:30459. doi:10.1038/srep30459
- Chen S, Xu D, Fan L, Fang Z, Wang X, Li M. 2022. Roles of N-Methyl-D-Aspartate Receptors (NMDARs) in Epilepsy. *Front Mol Neurosci* **14**:797253. doi:10.3389/fnmol.2021.797253
- Chen Z, Jalabi W, Hu W, Park H-J, Gale JT, Kidd GJ, Bernatowicz R, Gossman ZC, Chen JT, Dutta R, Trapp BD. 2014. Microglial displacement of inhibitory synapses provides neuroprotection in the adult brain. *Nat Commun* **5**:4486. doi:10.1038/ncomms5486
- Cheng S, Hou J, Zhang C, Xu C, Wang L, Zou X, Yu H, Shi Y, Yin Z, Chen G. 2015. Minocycline reduces neuroinflammation but does not ameliorate neuron loss in a mouse model of neurodegeneration. *Sci Rep* **5**:10535. doi:10.1038/srep10535
- Chess S, Fernandez P, Korn S. 1978. Behavioral consequences of congenital rubella. *J Pediatr* **93**:699–703. doi:10.1016/s0022-3476(78)80921-4
- Ching ASC, Kuhnast B, Damont A, Roeda D, Tavitian B, Dollé F. 2012. Current paradigm of the 18-kDa translocator protein (TSPO) as a molecular target for PET imaging in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *Insights Imaging* **3**:111–119. doi:10.1007/s13244-011-0128-x
- Chini M, Pöpplau JA, Lindemann C, Carol-Perdiguer L, Hnida M, Oberländer V, Xu X, Ahlbeck J, Bitzenhofer SH, Mulert C, Hanganu-Opatz IL. 2020. Resolving and Rescuing Developmental Miswiring in a Mouse Model of Cognitive Impairment. *Neuron* **105**:60-74.e7. doi:10.1016/j.neuron.2019.09.042
- Choi GB, Yim YS, Wong H, Kim S, Kim H, Kim SV, Hoeffler CA, Littman DR, Huh JR. 2016. The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science* **351**:933–939. doi:10.1126/science.aad0314

- Christoph G, Leonzio R, Wilcox K. 1986. Stimulation of the lateral habenula inhibits dopamine-containing neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat. *J Neurosci* **6**:613–619. doi:10.1523/JNEUROSCI.06-03-00613.1986
- Chu Y, Jin X, Parada I, Pesic A, Stevens B, Barres B, Prince DA. 2010. Enhanced synaptic connectivity and epilepsy in C1q knockout mice. *Proc Natl Acad Sci* **107**:7975–7980. doi:10.1073/pnas.0913449107
- Chung W-S, Allen NJ, Eroglu C. 2015. Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**:a020370. doi:10.1101/cshperspect.a020370
- Chung W-S, Clarke LE, Wang GX, Stafford BK, Sher A, Chakraborty C, Joung J, Foo LC, Thompson A, Chen C, Smith SJ, Barres BA. 2013. Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* **504**:394–400. doi:10.1038/nature12776
- Ciaranello AL, Ciaranello RD. 1995. The Neurobiology of Infantile Autism. *Annu Rev Neurosci* **18**:101–128.
- Clements JR, Grant S. 1990. Glutamate-like immunoreactivity in neurons of the laterodorsal tegmental and pedunculopontine nuclei in the rat. *Neurosci Lett* **120**:70–73. doi:10.1016/0304-3940(90)90170-E
- Coiro P, Padmashri R, Suresh A, Spartz E, Pendyala G, Chou S, Jung Y, Meays B, Roy S, Gautam N, Alnouti Y, Li M, Dunaevsky A. 2015. Impaired synaptic development in a maternal immune activation mouse model of neurodevelopmental disorders. *Brain Behav Immun* **50**:249–258. doi:10.1016/j.bbi.2015.07.022
- Colonnese MT, Constantine-Paton M. 2006. Developmental period for N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-dependent synapse elimination correlated with visuotopic map refinement. *J Comp Neurol* **494**:738–751. doi:10.1002/cne.20841
- Connell PH. 1957. Amphetamine psychosis. *Br Med J*.
- Copp AJ. 2005. Neurulation in the cranial region – normal and abnormal. *J Anat* **207**:623–635. doi:10.1111/j.1469-7580.2005.00476.x
- Creese I, Burt DR, Snyder SH. 1976. Dopamine Receptor Binding Predicts Clinical and Pharmacological Potencies of Antischizophrenic Drug. *Science*. doi:10.1126/science.3854
- Cross AJ, Crow TJ, Owen F. 1981. 3H-flupenthixol binding in post-mortem brains of schizophrenics: Evidence for a selective increase in dopamine D2 receptors. *Psychopharmacology (Berl)* **74**:122–124. doi:10.1007/BF00432676
- Crow TJ, Johnstone EC, Longden AJ, Owen F. 1978. Dopaminergic mechanisms in schizophrenia: The antipsychotic effect and the disease process. *Life Sci* **23**:575–579. doi:10.1016/0024-3205(78)90035-8
- Cserép C, Schwarcz AD, Pósfai B, László ZI, Kellermayer A, Környei Z, Kisfali M, Nyerges M, Lele Z, Katona I, Ádám Dénes. 2022. Microglial control of neuronal development [202]

via somatic purinergic junctions. *Cell Rep* **40**:111369.
doi:10.1016/j.celrep.2022.111369

- Cunningham CL, Martinez-Cerdeno V, Noctor SC. 2013. Microglia Regulate the Number of Neural Precursor Cells in the Developing Cerebral Cortex. *J Neurosci* **33**:4216–4233. doi:10.1523/JNEUROSCI.3441-12.2013
- Dahlgren J, Samuelsson A-M, Jansson T, Holmäng A. 2006. Interleukin-6 in the Maternal Circulation Reaches the Rat Fetus in Mid-gestation. *Pediatr Res* **60**:147–151. doi:10.1203/01.pdr.0000230026.74139.18
- Dantzer R. 2009. Cytokine, Sickness Behavior, and Depression. *Immunol Allergy Clin North Am* **29**:247–264. doi:10.1016/j.iac.2009.02.002
- De Biase LM, Schuebel KE, Fusfeld ZH, Jair K, Hawes IA, Cimbro R, Zhang H-Y, Liu Q-R, Shen H, Xi Z-X, Goldman D, Bonci A. 2017. Local Cues Establish and Maintain Region-Specific Phenotypes of Basal Ganglia Microglia. *Neuron* **95**:341-356.e6. doi:10.1016/j.neuron.2017.06.020
- De Deurwaerdère P, Di Giovanni G. 2017. Serotonergic modulation of the activity of mesencephalic dopaminergic systems: Therapeutic implications. *Prog Neurobiol* **151**:175–236. doi:10.1016/j.pneurobio.2016.03.004
- De Felice M, Melis M, Aroni S, Muntoni AL, Fanni S, Frau R, Devoto P, Pistis M. 2019. The PPAR α agonist fenofibrate attenuates disruption of dopamine function in a maternal immune activation rat model of schizophrenia. *CNS Neurosci Ther* **25**:549–561. doi:10.1111/cns.13087
- De S, Van Deren D, Peden E, Hockin M, Boulet A, Titen S, Capecchi MR. 2018. Two distinct ontogenies confer heterogeneity to mouse brain microglia. *Development* **145**:dev152306. doi:10.1242/dev.152306
- DeFelipe J, Fariñas I. 1992. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: Morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* **39**:563–607. doi:10.1016/0301-0082(92)90015-7
- Dejanovic B, Wu T, Tsai M-C, Graykowski D, Gandham VD, Rose CM, Bakalarski CE, Ngu H, Wang Y, Pandey S, Rezzonico MG, Friedman BA, Edmonds R, De Mazière A, Rakosi-Schmidt R, Singh T, Klumperman J, Foreman O, Chang MC, Xie L, Sheng M, Hanson JE. 2022. Complement C1q-dependent excitatory and inhibitory synapse elimination by astrocytes and microglia in Alzheimer’s disease mouse models. *Nat Aging* **2**:837–850. doi:10.1038/s43587-022-00281-1
- Deutsch SI, Luyo ZNM, Burket JA. 2022. Targeted NMDA Receptor Interventions for Autism: Developmentally Determined Expression of GluN2B and GluN2A-Containing Receptors and Balanced Allosteric Modulatory Approaches. *Biomolecules* **12**:181. doi:10.3390/biom12020181
- Deykin EY, Macmahon B. 1979. VIRAL EXPOSURE AND AUTISM. *Am J Epidemiol* **109**:628–638. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a112726

- Di Liberto G, Egervari K, Kreutzfeldt M, Schürch CM, Hewer E, Wagner I, Du Pasquier R, Merkler D. 2022. Neurodegenerative phagocytes mediate synaptic stripping in Neuro-HIV. *Brain* **145**:2730–2741. doi:10.1093/brain/awac102
- Dichter GS, Felder JN, Green SR, Rittenberg AM, Sasson NJ, Bodfish JW. 2012. Reward circuitry function in autism spectrum disorders. *Soc Cogn Affect Neurosci* **7**:160–172. doi:10.1093/scan/nsq095
- Dobi A, Margolis EB, Wang H-L, Harvey BK, Morales M. 2010. Glutamatergic and Nonglutamatergic Neurons of the Ventral Tegmental Area Establish Local Synaptic Contacts with Dopaminergic and Nondopaminergic Neurons. *J Neurosci* **30**:218–229. doi:10.1523/JNEUROSCI.3884-09.2010
- Dominguez-Mejide A, Rodriguez-Perez AI, Diaz-Ruiz C, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 2017. Dopamine modulates astroglial and microglial activity via glial renin-angiotensin system in cultures. *Brain Behav Immun* **62**:277–290. doi:10.1016/j.bbi.2017.02.013
- Druart M, Le Magueresse C. 2019. Emerging Roles of Complement in Psychiatric Disorders. *Front Psychiatry* **10**:573. doi:10.3389/fpsy.2019.00573
- Druart M, Nosten-Bertrand M, Poll S, Crux S, Nebeling F, Delhay C, Dubois Y, Mittag M, Leboyer M, Tamouza R, Fuhrmann M, Le Magueresse C. 2021. Elevated expression of complement C4 in the mouse prefrontal cortex causes schizophrenia-associated phenotypes. *Mol Psychiatry* **26**:3489–3501. doi:10.1038/s41380-021-01081-6
- Du Y, Ma Z, Lin S, Dodel RC, Gao F, Bales KR, Triarhou LC, Chernet E, Perry KW, Nelson DL, Luecke S, Phebus LA, Bymaster FP, Paul SM. 2001. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:14669–14674. doi:10.1073/pnas.251341998
- Ducrot C, Bourque M-J, Delmas CVL, Racine A-S, Guadarrama Bello D, Delignat-Lavaud B, Domenic Lycas M, Fallon A, Michaud-Tardif C, Burke Nanni S, Herborg F, Gether U, Nanci A, Takahashi H, Parent M, Trudeau L-E. 2021. Dopaminergic neurons establish a distinctive axonal arbor with a majority of non-synaptic terminals. *FASEB J* **35**:e21791. doi:10.1096/fj.202100201RR
- Dudvarski Stankovic N, Teodorczyk M, Ploen R, Zipp F, Schmidt MHH. 2016. Microglia–blood vessel interactions: a double-edged sword in brain pathologies. *Acta Neuropathol (Berl)* **131**:347–363. doi:10.1007/s00401-015-1524-y
- Easley-Neal C, Foreman O, Sharma N, Zarrin AA, Weimer RM. 2019. CSF1R Ligands IL-34 and CSF1 Are Differentially Required for Microglia Development and Maintenance in White and Gray Matter Brain Regions. *Front Immunol* **10**:2199. doi:10.3389/fimmu.2019.02199
- Edler MK, Mhatre-Winters I, Richardson JR. 2021. Microglia in Aging and Alzheimer's Disease: A Comparative Species Review. *Cells* **10**:1138. doi:10.3390/cells10051138
- Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, Lysiak JJ, Harden TK, Leitinger N, Ravichandran KS.

2009. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* **461**:282–286. doi:10.1038/nature08296
- Eltokhi A, Santuy A, Merchan-Perez A, Sprengel R. 2020. Glutamatergic Dysfunction and Synaptic Ultrastructural Alterations in Schizophrenia and Autism Spectrum Disorder: Evidence from Human and Rodent Studies. *Int J Mol Sci* **22**:59. doi:10.3390/ijms22010059
- Erblich B, Zhu L, Etgen AM, Dobrenis K, Pollard JW. 2011. Absence of Colony Stimulation Factor-1 Receptor Results in Loss of Microglia, Disrupted Brain Development and Olfactory Deficits. *PLoS ONE* **6**:e26317. doi:10.1371/journal.pone.0026317
- Erlander MG, Tillakaratne NJK, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ. 1991. Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* **7**:91–100. doi:10.1016/0896-6273(91)90077-D
- Erlenmeyer-Kimling L, Folnegovic Z, Hrabak-Zerjavic V, Borcic B, Folnegovic-Smalc V, Susser E. 1994. Schizophrenia and prenatal exposure to the 1957 A2 influenza epidemic in Croatia. *Am J Psychiatry* **151**:1496–1498. doi:10.1176/ajp.151.10.1496
- Ernst M, Zametkin A, Matochik J, Pascualvaca D, Cohen R. 1997. Low medial prefrontal dopaminergic activity in autistic children. *The Lancet* **350**:638. doi:10.1016/S0140-6736(05)63326-0
- Esshili A, Manitz M-P, Freund N, Juckel G. 2020. Induction of inducible nitric oxide synthase expression in activated microglia and astrocytes following pre- and postnatal immune challenge in an animal model of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* **35**:100–110. doi:10.1016/j.euroneuro.2020.04.002
- Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. 2001. Loss of Phospholipid Asymmetry and Surface Exposure of Phosphatidylserine Is Required for Phagocytosis of Apoptotic Cells by Macrophages and Fibroblasts. *J Biol Chem* **276**:1071–1077. doi:10.1074/jbc.M003649200
- Fan Y, Chen Z, Pathak JL, Carneiro AMD, Chung CY. 2018. Differential Regulation of Adhesion and Phagocytosis of Resting and Activated Microglia by Dopamine. *Front Cell Neurosci* **12**:309. doi:10.3389/fncel.2018.00309
- Färber K, Pannasch U, Kettenmann H. 2005. Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells. *Mol Cell Neurosci* **29**:128–138. doi:10.1016/j.mcn.2005.01.003
- Fatemi SH. 2008. The hyperglutamatergic hypothesis of autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **32**:911. doi:10.1016/j.pnpbp.2007.11.004
- Favuzzi E, Huang S, Saldi GA, Binan L, Ibrahim LA, Fernández-Otero M, Cao Y, Zeine A, Sefah A, Zheng K, Xu Q, Khlestova E, Farhi SL, Bonneau R, Datta SR, Stevens B, Fishell G. 2021. GABA-receptive microglia selectively sculpt developing inhibitory circuits. *Cell* **184**:4048–4063.e32. doi:10.1016/j.cell.2021.06.018

- Favuzzi E, Rico B. 2018. Molecular diversity underlying cortical excitatory and inhibitory synapse development. *Curr Opin Neurobiol* **53**:8–15. doi:10.1016/j.conb.2018.03.011
- Fernandez E, Schiappa R, Girault J-A, Le Novere N. 2005. DARPP-32 is a robust integrator of dopamine and glutamate signals. *PLoS Comput Biol* **preprint**:e176. doi:10.1371/journal.pcbi.0020176.eor
- Fernández-Arjona M del M, Grondona JM, Granados-Durán P, Fernández-Llebrez P, López-Ávalos MD. 2017. Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis. *Front Cell Neurosci* **11**:235. doi:10.3389/fncel.2017.00235
- Fillman SG, Cloonan N, Catts VS, Miller LC, Wong J, McCrossin T, Cairns M, Weickert CS. 2013. Increased inflammatory markers identified in the dorsolateral prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. *Mol Psychiatry* **18**:206–214. doi:10.1038/mp.2012.110
- Floresco SB, West AR, Ash B, Moore H, Grace AA. 2003. Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nat Neurosci* **6**:968–973. doi:10.1038/nn1103
- Fonseca MI, Chu S-H, Hernandez MX, Fang MJ, Modarresi L, Selvan P, MacGregor GR, Tenner AJ. 2017. Cell-specific deletion of C1qa identifies microglia as the dominant source of C1q in mouse brain. *J Neuroinflammation* **14**:48. doi:10.1186/s12974-017-0814-9
- Fontainhas AM, Wang M, Liang KJ, Chen S, Mettu P, Damani M, Fariss RN, Li W, Wong WT. 2011. Microglial Morphology and Dynamic Behavior Is Regulated by Ionotropic Glutamatergic and GABAergic Neurotransmission. *PLoS ONE* **6**:e15973. doi:10.1371/journal.pone.0015973
- Ford CP. 2014. The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. *Neuroscience* **282**:13–22. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.01.025
- Ford CP, Gantz SC, Phillips PEM, Williams JT. 2010. Control of Extracellular Dopamine at Dendrite and Axon Terminals.
- Franco R, Fernández-Suárez D. 2015. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol* **131**:65–86. doi:10.1016/j.pneurobio.2015.05.003
- Friedman AD. 2009. Cell cycle and developmental control of hematopoiesis by Runx1. *J Cell Physiol* **219**:520–524. doi:10.1002/jcp.21738
- Fromer M, Pocklington AJ, Kavanagh DH, Williams HJ, Dwyer S, Gormley P, Georgieva L, Rees E, Palta P, Ruderfer DM, Carrera N, Humphreys I, Johnson JS, Roussos P, Barker DD, Banks E, Milanova V, Grant SG, Hannon E, Rose SA, Chambert K, Mahajan M, Scolnick EM, Moran JL, Kirov G, Palotie A, McCarroll SA, Holmans P, Sklar P, Owen MJ, Purcell SM, O'Donovan MC. 2014. De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. *Nature* **506**:179–184. doi:10.1038/nature12929

- Fu Y, Yuan Y, Halliday G, Rusznák Z, Watson C, Paxinos G. 2012. A cytoarchitectonic and chemoarchitectonic analysis of the dopamine cell groups in the substantia nigra, ventral tegmental area, and retrorubral field in the mouse. *Brain Struct Funct* **217**:591–612. doi:10.1007/s00429-011-0349-2
- Fuller Torrey E, Rawlings R, Waldman IN. 1988. Schizophrenic births and viral diseases in two states. *Schizophr Res* **1**:73–77. doi:10.1016/0920-9964(88)90043-6
- Gabbott PLA, Warner TA, Jays PRL, Salway P, Busby SJ. 2005. Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol* **492**:145–177. doi:10.1002/cne.20738
- Garaschuk O, Verkhratsky A, editors. 2019. *Microglia: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York. doi:10.1007/978-1-4939-9658-2
- Garbett K, Ebert PJ, Mitchell A, Lintas C, Manzi B, Mirnics K, Persico AM. 2008. Immune transcriptome alterations in the temporal cortex of subjects with autism. *Neurobiol Dis* **30**:303–311. doi:10.1016/j.nbd.2008.01.012
- Garey L, Ong W, Patel T, Kanani M, Davis A, Mortimer A, Barnes T, Hirsch S. 1998. Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **65**:446–453.
- Gariano RF, Groves PM. 1988. Burst firing induced in midbrain dopamine neurons by stimulation of the medial prefrontal and anterior cingulate cortices. *Brain Res* **462**:194–198. doi:10.1016/0006-8993(88)90606-3
- Garver DL, Tamas RL, Holcomb JA. 2003. Elevated Interleukin-6 in the Cerebrospinal Fluid of a Previously Delineated Schizophrenia Subtype. *Neuropsychopharmacology* **28**:1515–1520. doi:10.1038/sj.npp.1300217
- Geisler S, Derst C, Veh RW, Zahm DS. 2007. Glutamatergic Afferents of the Ventral Tegmental Area in the Rat. *J Neurosci* **27**:5730–5743. doi:10.1523/JNEUROSCI.0012-07.2007
- Georges F, Aston-Jones G. 2002. Activation of Ventral Tegmental Area Cells by the Bed Nucleus of the Stria Terminalis: A Novel Excitatory Amino Acid Input to Midbrain Dopamine Neurons. *J Neurosci* **22**:5173–5187. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-12-05173.2002
- Georges F, Aston-Jones G. 2001. Potent Regulation of Midbrain Dopamine Neurons by the Bed Nucleus of the Stria Terminalis. *J Neurosci* **21**:RC160–RC160. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-16-j0003.2001
- Gerfen CR. 1988. Synaptic organization of the striatum. *J Electron Microscop Tech* **10**:265–281. doi:10.1002/jemt.1060100305
- German CL, Baladi MG, McFadden LM, Hanson GR, Fleckenstein AE. 2015. Regulation of the Dopamine and Vesicular Monoamine Transporters: Pharmacological Targets and Implications for Disease. *Pharmacol Rev* **67**:1005–1024. doi:10.1124/pr.114.010397

- German DC, Manaye KF. 1993. Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): Three-dimensional reconstruction in the rat. *J Comp Neurol* **331**:297–309. doi:10.1002/cne.903310302
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. 2010. Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* **330**:841–845. doi:10.1126/science.1194637
- Ginhoux F, Merad M. 2011. Les cellules de la microglie: Leurs origines extra-embryonnaires enfin révélées. *médecine/sciences* **27**:719–724. doi:10.1051/medsci/2011278013
- Ginhoux F, Prinz M. 2015. Origin of Microglia: Current Concepts and Past Controversies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**:a020537. doi:10.1101/cshperspect.a020537
- Girault J-A, Nairn AC. 2021. DARPP-32 40 years later *Advances in Pharmacology*. Elsevier. pp. 67–87. doi:10.1016/bs.apha.2020.09.004
- Giulian D, Young D, Woodward J, Brown D, Lachman L. 1988. Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. *J Neurosci* **8**:709–714. doi:10.1523/JNEUROSCI.08-02-00709.1988
- Glantz LA, Lewis DA. 2000. Decreased Dendritic Spine Density on Prefrontal Cortical Pyramidal Neurons in Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* **57**:65. doi:10.1001/archpsyc.57.1.65
- Glantz LA, Lewis DA. 1997. Reduction of synaptophysin immunoreactivity in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. Regional and diagnostic specificity. *Arch Gen Psychiatry* **54**:943–952. doi:10.1001/archpsyc.1997.01830220065010
- Glausier JR, Lewis DA. 2013. Dendritic Spine Pathology in Schizophrenia. *Neuroscience* **251**:90–107. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.04.044
- Goda Y, Davis GW. 2003. Mechanisms of Synapse Assembly and Disassembly. *Neuron* **40**:243–264. doi:10.1016/S0896-6273(03)00608-1
- Gofflot F, Hall M, Morriss-Kay G m. 1997. Genetic patterning of the developing mouse tail at the time of posterior neuropore closure. *Dev Dyn* **210**:431–445. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199712)210:4<431::AID-AJA7>3.0.CO;2-H
- Golden GS. 1972. Embryologic demonstration of a nigro-striatal projection in the mouse. *Brain Res* **44**:278–282. doi:10.1016/0006-8993(72)90384-8
- Gómez Morillas A, Besson VC, Lerouet D. 2021. Microglia and Neuroinflammation: What Place for P2RY12? *Int J Mol Sci* **22**:1636. doi:10.3390/ijms22041636
- Gonzalez-Burgos G, Lewis DA. 2012. NMDA Receptor Hypofunction, Parvalbumin-Positive Neurons, and Gamma Oscillations in Schizophrenia. *Schizophr Bull* **38**:950–957. doi:10.1093/schbul/sbs010

- Gonzalez-Perez O, Gutierrez-Fernandez F, Lopez-Virgen V, Collas-Aguilar J, Quinones-Hinojosa A, Garcia-Verdugo JM. 2012. Immunological regulation of neurogenic niches in the adult brain. *Neuroscience* **226**:270–281. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.08.053
- Grabert K, Michoel T, Karavolos MH, Clohisey S, Baillie JK, Stevens MP, Freeman TC, Summers KM, McColl BW. 2016. Microglial brain region–dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat Neurosci* **19**:504–516. doi:10.1038/nn.4222
- Greengard P. 2001. The Neurobiology of Slow Synaptic Transmission. *Science* **294**:1024–1030. doi:10.1126/science.294.5544.1024
- Greter M, Lelios I, Pelczar P, Hoeffel G, Price J, Leboeuf M, Kündig TM, Frei K, Ginhoux F, Merad M, Becher B. 2012. Stroma-Derived Interleukin-34 Controls the Development and Maintenance of Langerhans Cells and the Maintenance of Microglia. *Immunity* **37**:1050–1060. doi:10.1016/j.immuni.2012.11.001
- Gunaydin LA, Grosenick L, Finkelstein JC, Kauvar IV, Fenno LE, Adhikari A, Lammel S, Mirzabekov JJ, Airan RD, Zalocusky KA, Tye KM, Anikeeva P, Malenka RC, Deisseroth K. 2014. Natural Neural Projection Dynamics Underlying Social Behavior. *Cell* **157**:1535–1551. doi:10.1016/j.cell.2014.05.017
- Hall H, Sedvall G, Magnusson O, Kopp J, Haldin C, Farde L. 1994. Distribution of D1- and D2-Dopamine Receptors, and Dopamine and Its Metabolites in the Human Brain. *Neuropsychopharmacology* **11**:245–256.
- Hammer C, Stepniak B, Schneider A, Papiol S, Tantra M, Begemann M, Sirén A-L, Pardo LA, Sperling S, Mohd Jofrry S, Gurvich A, Jensen N, Ostmeier K, Lühder F, Probst C, Martens H, Gillis M, Saher G, Assogna F, Spalletta G, Stöcker W, Schulz TF, Nave K-A, Ehrenreich H. 2014. Neuropsychiatric disease relevance of circulating anti-NMDA receptor autoantibodies depends on blood–brain barrier integrity. *Mol Psychiatry* **19**:1143–1149. doi:10.1038/mp.2013.110
- Hankins HM, Baldrige RD, Xu P, Graham TR. 2015. Role of Flippases, Scramblases and Transfer Proteins in Phosphatidylserine Subcellular Distribution. *Traffic* **16**:35–47. doi:10.1111/tra.12233
- Harrison PJ. 2000. Postmortem studies in schizophrenia. *Dialogues Clin Neurosci* **2**.
- Haruwaka K, Ikegami A, Tachibana Y, Ohno N, Konishi H, Hashimoto A, Matsumoto M, Kato D, Ono R, Kiyama H, Moorhouse AJ, Nabekura J, Wake H. 2019. Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation. *Nat Commun* **10**:5816. doi:10.1038/s41467-019-13812-z
- Hattori Y. 2022. The microglia-blood vessel interactions in the developing brain | Elsevier Enhanced Reader. doi:10.1016/j.neures.2022.09.006
- Hayes LN, An K, Carloni E, Li F, Vincent E, Trippaers C, Paranjpe M, Dölen G, Goff LA, Ramos A, Kano S, Sawa A. 2022. Prenatal immune stress blunts microglia reactivity, impairing neurocircuitry. *Nature* **610**:327–334. doi:10.1038/s41586-022-05274-z

- Hegarty SV, Sullivan AM, O’Keeffe GW. 2013. Midbrain dopaminergic neurons: A review of the molecular circuitry that regulates their development. *Dev Biol* **379**:123–138. doi:10.1016/j.ydbio.2013.04.014
- Hercher C, Chopra V, Beasley CL. 2014. Evidence for morphological alterations in prefrontal white matter glia in schizophrenia and bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci* **39**:376–385. doi:10.1503/jpn.130277
- Herman JP, Cullinan WE. 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis. *Trends Neurosci* **20**:78–84. doi:10.1016/S0166-2236(96)10069-2
- Hilker R, Helenius D, Fagerlund B, Skyttthe A, Christensen K, Werge TM, Nordentoft M, Glenthøj B. 2018. Heritability of Schizophrenia and Schizophrenia Spectrum Based on the Nationwide Danish Twin Register. *Biol Psychiatry* **83**:492–498. doi:10.1016/j.biopsych.2017.08.017
- Hjelmstad GO, Xia Y, Margolis EB, Fields HL. 2013. Opioid Modulation of Ventral Pallidal Afferents to Ventral Tegmental Area Neurons. *J Neurosci* **33**:6454–6459. doi:10.1523/JNEUROSCI.0178-13.2013
- Holley SA, Jackson PD, Sasai Y, Lu B, Robertis EMD, Hoffmann FM, Ferguson EL. 1995. A conserved system for dorsal-ventral patterning in insects and vertebrates involving sog and chordin. *Nature* **376**:249–253. doi:10.1038/376249a0
- Holley SA, Neul JL, Attisano L, Wrana JL, Sasai Y, O’Connor MB, Robertis EMD, Ferguson EL. 1996. The Xenopus Dorsalizing Factor noggin Ventralizes Drosophila Embryos by Preventing DPP from Activating Its Receptor. *Cell* **86**:607–617. doi:10.1016/S0092-8674(00)80134-8
- Hope KT, Hawes IA, Moca EN, Bonci A, De Biase LM. 2020. Maturation of the microglial population varies across mesolimbic nuclei. *Eur J Neurosci* **52**:3689–3709. doi:10.1111/ejn.14740
- Hua JY, Smith SJ. 2004. Neural activity and the dynamics of central nervous system development. *Nat Neurosci* **7**:327–332. doi:10.1038/nn1218
- Hughes RN, Watson GDR, Petter EA, Kim N, Bakhurin KI, Yin HH. 2019. Precise Coordination of Three-Dimensional Rotational Kinematics by Ventral Tegmental Area GABAergic Neurons. *Curr Biol* **29**:3244–3255.e4. doi:10.1016/j.cub.2019.08.022
- Hussain T, Murtaza G, Kalhoro DH, Kalhoro MS, Yin Y, Chughtai MI, Tan B, Yaseen A, Rehman ZU. 2022. Understanding the Immune System in Fetal Protection and Maternal Infections during Pregnancy. *J Immunol Res* **2022**:1–12. doi:10.1155/2022/7567708
- Hutton J. 2016. Does Rubella Cause Autism: A 2015 Reappraisal? *Front Hum Neurosci* **10**. doi:10.3389/fnhum.2016.00025
- Iram T, Ramirez-Ortiz Z, Byrne MH, Coleman UA, Kingery ND, Means TK, Frenkel D, El Khoury J. 2016. Megf10 Is a Receptor for C1Q That Mediates Clearance of Apoptotic

- Cells by Astrocytes. *J Neurosci* **36**:5185–5192. doi:10.1523/JNEUROSCI.3850-15.2016
- Ivarsson SA, Vegförs P, Ahlfors K. 1990. Autism as One of Several Disabilities in Two Children with Congenital Cytomegalovirus Infection. *Neuropediatrics* 102–103.
- Jack CS, Arbour N, Manusow J, Montgrain V, Blain M, McCrea E, Shapiro A, Antel JP. 2005. TLR Signaling Tailors Innate Immune Responses in Human Microglia and Astrocytes. *J Immunol* **175**:4320–4330. doi:10.4049/jimmunol.175.7.4320
- Jacobson M, Rao MS, editors. 2005. Developmental neurobiology, 4th ed. ed. New York: Kluwer Academic/Plenum.
- Jalabert M, Aston-Jones G, Herzog E, Manzoni O, Georges F. 2009. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the control of ventral tegmental area dopamine neurons. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **33**:1336–1346. doi:10.1016/j.pnpbp.2009.07.010
- Janssen MJ, Ade KK, Fu Z, Vicini S. 2009. Dopamine Modulation of GABA Tonic Conductance in Striatal Output Neurons. *J Neurosci* **29**:5116–5126. doi:10.1523/JNEUROSCI.4737-08.2009
- Jhou TC, Fields HL, Baxter MG, Saper CB, Holland PC. 2009. The Rostromedial Tegmental Nucleus (RMTg), a GABAergic Afferent to Midbrain Dopamine Neurons, Encodes Aversive Stimuli and Inhibits Motor Responses. *Neuron* **61**:786–800. doi:10.1016/j.neuron.2009.02.001
- Jin H, Li L, Xu J, Zhen F, Zhu L, Liu PP, Zhang M, Zhang W, Wen Z. 2012. Runx1 regulates embryonic myeloid fate choice in zebrafish through a negative feedback loop inhibiting Pu.1 expression. *Blood* **119**:5239–5249. doi:10.1182/blood-2011-12-398362
- Kalivas PW, Churchill L, Klitenick MA. 1993. GABA and enkephalin projection from the nucleus accumbens and ventral pallidum to the ventral tegmental area. *Neuroscience* **57**:1047–1060. doi:10.1016/0306-4522(93)90048-K
- Karlsson P, Farde L, Halldin C, Sedvall G. 2002. PET Study of D₁ Dopamine Receptor Binding in Neuroleptic-Naive Patients With Schizophrenia. *Am J Psychiatry* **159**:761–767. doi:10.1176/appi.ajp.159.5.761
- Kassotaki I, Valsamakis G, Mastorakos G, Grammatopoulos DK. 2021. Placental CRH as a Signal of Pregnancy Adversity and Impact on Fetal Neurodevelopment. *Frontiers in Endocrinology* **12**.
- Kawano H, Ohyama K, Kawamura K, Nagatsu I. 1995. Migration of dopaminergic neurons in the embryonic mesencephalon of mice. *Dev Brain Res* **86**:101–113. doi:10.1016/0165-3806(95)00018-9
- Kawano M, Kawasaki A, Sakata-Haga H, Fukui Y, Kawano H, Nogami H, Hisano S. 2006. Particular subpopulations of midbrain and hypothalamic dopamine neurons express vesicular glutamate transporter 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* **498**:581–592. doi:10.1002/cne.21054

- Kebabian JW, Calne DB. 1979. Multiple receptors for dopamine. *Nature* **277**:93–96. doi:10.1038/277093a0
- Keiflin R, Pribut HJ, Shah NB, Janak PH. 2019. Ventral Tegmental Dopamine Neurons Participate in Reward Identity Predictions. *Curr Biol* **29**:93-103.e3. doi:10.1016/j.cub.2018.11.050
- Kendell RE, Kemp IW. 1989. Maternal Influenza in the Etiology of Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* **46**:878–882. doi:10.1001/archpsyc.1989.01810100020004
- Kenkhuis B, Somarakis A, Kleindouwel LRT, an Roon-Mom WMC, Höllt T, van der Weerd L. 2022. Co-expression patterns of microglia markers Iba1, TMEM119 and P2RY12 in Alzheimer’s disease | Elsevier Enhanced Reader. *Neurobiol Dis* **167**. doi:10.1016/j.nbd.2022.105684
- Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, Wieghofer P, Heinrich A, Riemke P, Hölscher C, Müller DN, Luckow B, Brocker T, Debowski K, Fritz G, Opdenakker G, Diefenbach A, Biber K, Heikenwalder M, Geissmann F, Rosenbauer F, Prinz M. 2013. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci* **16**:273–280. doi:10.1038/nn.3318
- Kim J-I, Ganesan S, Luo SX, Wu Y-W, Park E, Huang EJ, Chen L, Ding JB. 2015. Aldehyde dehydrogenase 1a1 mediates a GABA synthesis pathway in midbrain dopaminergic neurons. *Science* **350**:102–106. doi:10.1126/science.aac4690
- Kim J-Y, Koh HC, Lee J-Y, Chang M-Y, Kim Y-C, Chung H-Y, Son H, Lee Y-S, Studer L, McKay R, Lee S-H. 2003. Dopaminergic neuronal differentiation from rat embryonic neural precursors by Nurr1 overexpression. *J Neurochem* **85**:1443–1454. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01780.x
- Kloss CU, Kreutzberg GW, Raivich G. 1997. Proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer: characterization of stimulatory and inhibitory cytokines. *J Neurosci Res* **49**:248–254.
- Knable MB, Hyde TM, Murray AM, Herman MM, Kleinman JE. 1996. A postmortem study of frontal cortical dopamine D1 receptors in schizophrenics, psychiatric controls, and normal controls. *Biol Psychiatry* **40**:1191–1199. doi:10.1016/S0006-3223(96)00116-3
- Knuesel I, Chicha L, Britschgi M, Schobel SA, Bodmer M, Hellings JA, Toovey S, Prinszen EP. 2014. Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nat Rev Neurol* **10**:643–660. doi:10.1038/nrneurol.2014.187
- Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, Hirano K, Uchimura K, Sakamoto K, Hirakawa A, Takeuchi H, Suzumura A, Ishiguro N, Kadomatsu K. 2013. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis* **4**:e525–e525. doi:10.1038/cddis.2013.54
- Koushik SV, Wang J, Rogers R, Moskophidis D, Lambert NA, Creazzo TL, Conway SJ. 2001. Targeted inactivation of the sodium-calcium exchanger (Ncx1) results in the lack of a heartbeat and abnormal myofibrillar organization. *FASEB J*.

- Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* **19**:312–318. doi:10.1016/0166-2236(96)10049-7
- Krystal JH, Perry EB Jr, Gueorguieva R, Belger A, Madonick SH, Abi-Dargham A, Cooper TB, MacDougall L, Abi-Saab W, D'Souza DC. 2005. Comparative and Interactive Human Psychopharmacologic Effects of Ketamine and Amphetamine: Implications for Glutamatergic and Dopaminergic Model Psychoses and Cognitive Function. *Arch Gen Psychiatry* **62**:985–995. doi:10.1001/archpsyc.62.9.985
- Kubota M, Fujino J, Tei S, Takahata K, Matsuoka K, Tagai K, Sano Y, Yamamoto Y, Shimada H, Takado Y, Seki C, Itahashi T, Aoki YY, Ohta H, Hashimoto R, Zhang M-R, Suhara T, Nakamura M, Takahashi H, Kato N, Higuchi M. 2020. Binding of Dopamine D1 Receptor and Noradrenaline Transporter in Individuals with Autism Spectrum Disorder: A PET Study. *Cereb Cortex* **30**:6458–6468. doi:10.1093/cercor/bhaa211
- Kudo T, Uchigashima M, Miyazaki T, Konno K, Yamasaki M, Yanagawa Y, Minami M, Watanabe M. 2012. Three Types of Neurochemical Projection from the Bed Nucleus of the Stria Terminalis to the Ventral Tegmental Area in Adult Mice. *J Neurosci* **32**:18035–18046. doi:10.1523/JNEUROSCI.4057-12.2012
- Kumar H, Sharma B. 2016. Minocycline ameliorates prenatal valproic acid induced autistic behaviour, biochemistry and blood brain barrier impairments in rats. *Brain Res* **1630**:83–97. doi:10.1016/j.brainres.2015.10.052
- Kumar V. 2019. Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation. *J Neuroimmunol* **332**:16–30. doi:10.1016/j.jneuroim.2019.03.012
- Kunugi H, Nanko S, Takei N. 1992. Influenza and schizophrenia in Japan. *Br J Psychiatry* **161**:274–275. doi:10.1192/bjp.161.2.274
- Kupchik YM, Brown RM, Heinsbroek JA, Lobo MK, Schwartz DJ, Kalivas PW. 2015. Coding the direct/indirect pathways by D1 and D2 receptors is not valid for accumbens projections. *Nat Neurosci* **18**:1230–1232. doi:10.1038/nn.4068
- Lai M-C, Lombardo MV, Baron-Cohen S. 2014. Autism. *The Lancet* **383**:896–910. doi:10.1016/S0140-6736(13)61539-1
- Lamb TM, Knecht AK, Smith WC, Stachel SE, Economides AN, Stahl N, Yancopoulos GD, Harland RM. 1993. Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science* **262**:713–718. doi:10.1126/science.8235591
- Lammel S, Hetzel A, Häckel O, Jones I, Liss B, Roeper J. 2008. Unique Properties of Mesoprefrontal Neurons within a Dual Mesocorticolimbic Dopamine System. *Neuron* **57**:760–773. doi:10.1016/j.neuron.2008.01.022
- Lammel S, Lim BK, Ran C, Huang KW, Betley MJ, Tye KM, Deisseroth K, Malenka RC. 2012. Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* **491**:212–217. doi:10.1038/nature11527
- Lecca S, Luchicchi A, Scherma M, Fadda P, Muntoni AL, Pistis M. 2019. Δ 9-Tetrahydrocannabinol During Adolescence Attenuates Disruption of Dopamine

- Function Induced in Rats by Maternal Immune Activation. *Front Behav Neurosci* **13**:202. doi:10.3389/fnbeh.2019.00202
- Lecca S, Melis M, Luchicchi A, Ennas MG, Castelli MP, Muntoni AL, Pistis M. 2011. Effects of Drugs of Abuse on Putative Rostromedial Tegmental Neurons, Inhibitory Afferents to Midbrain Dopamine Cells. *Neuropsychopharmacology* **36**:589–602. doi:10.1038/npp.2010.190
- Lecca S, Melis M, Luchicchi A, Muntoni AL, Pistis M. 2012. Inhibitory Inputs from Rostromedial Tegmental Neurons Regulate Spontaneous Activity of Midbrain Dopamine Cells and Their Responses to Drugs of Abuse. *Neuropsychopharmacology* **37**:1164–1176. doi:10.1038/npp.2011.302
- Lehnardt S. 2010. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: The role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* **58**:253–263. doi:10.1002/glia.20928
- Levkovitz Y, Mendlovich S, Riwkes S, Braw Y, Levkovitch-Verbin H, Gal G, Fennig S, Treves I, Kron S. 2010. A double-blind, randomized study of minocycline for the treatment of negative and cognitive symptoms in early-phase schizophrenia. *J Clin Psychiatry* **71**:138–149. doi:10.4088/JCP.08m04666yel
- Leyh J, Paeschke S, Mages B, Michalski D, Nowicki M, Bechmann I, Winter K. 2021. Classification of Microglial Morphological Phenotypes Using Machine Learning. *Front Cell Neurosci* **15**:701673. doi:10.3389/fncel.2021.701673
- Li X, Chen W, Huang X, Jing W, Zhang T, Yu Q, Yu H, Li H, Tian Q, Ding Y, Lu Y. 2021. Synaptic dysfunction of Aldh1a1 neurons in the ventral tegmental area causes impulsive behaviors. *Mol Neurodegener* **16**:73. doi:10.1186/s13024-021-00494-9
- Li Y, Du X, Liu C, Wen Z, Du J. 2012. Reciprocal Regulation between Resting Microglial Dynamics and Neuronal Activity In Vivo. *Dev Cell* **23**:1189–1202. doi:10.1016/j.devcel.2012.10.027
- Liang C-L, Sinton CM, German DC. 1996. Midbrain dopaminergic neurons in the mouse: colocalization with Calbindin-D28k and calretinin. *Neuroscience* **75**:523–533. doi:10.1016/0306-4522(96)00228-X
- Libbey J, Sweeten T, McMahon W, Fujinami R. 2005. Autistic disorder and viral infections. *J Neurovirol* **11**:1–10. doi:10.1080/13550280590900553
- Lim S-H, Park E, You B, Jung Y, Park A-R, Park SG, Lee J-R. 2013. Neuronal Synapse Formation Induced by Microglia and Interleukin 10. *PLoS ONE* **8**:e81218. doi:10.1371/journal.pone.0081218
- Litvinchuk A, Wan Y-W, Swartzlander DB, Chen F, Cole A, Propson NE, Wang Q, Zhang B, Liu Z, Zheng H. 2018. Complement C3aR Inactivation Attenuates Tau Pathology and Reverses an Immune Network Deregulated in Tauopathy Models and Alzheimer's Disease. *Neuron* **100**:1337-1353.e5. doi:10.1016/j.neuron.2018.10.031

- Liu C, Goel P, Kaeser PS. 2021. Spatial and temporal scales of dopamine transmission. *Nat Rev Neurosci* **22**:345–358. doi:10.1038/s41583-021-00455-7
- Liu C, Kaeser PS. 2019. Mechanisms and regulation of dopamine release. *Curr Opin Neurobiol* **57**:46–53. doi:10.1016/j.conb.2019.01.001
- Liu H, Leak RK, Hu X. 2016. Neurotransmitter receptors on microglia. *BMJ* **1**:52–58. doi:10.1136/svn-2016-000012
- Lodge DJ. 2011. The Medial Prefrontal and Orbitofrontal Cortices Differentially Regulate Dopamine System Function. *Neuropsychopharmacology* **36**:1227–1236. doi:10.1038/npp.2011.7
- Luchicchi A, Lecca S, Melis M, De Felice M, Cadeddu F, Frau R, Muntoni AL, Fadda P, Devoto P, Pistis M. 2016. Maternal Immune Activation Disrupts Dopamine System in the Offspring. *Int J Neuropsychopharmacol* **19**:pyw007. doi:10.1093/ijnp/pyw007
- Lukmanji S, Manji SA, Kadhim S, Sauro KM, Wirrell EC, Kwon C-S, Jetté N. 2019. The co-occurrence of epilepsy and autism: A systematic review. *Epilepsy Behav* **98**:238–248. doi:10.1016/j.yebeh.2019.07.037
- Macdonald H, Kelly RG, Allen ES, Noble JF, Kanegis LA. 1973. Pharmacokinetic studies on minocycline in man. *Clin Pharmacol Ther* **14**:852–861. doi:10.1002/cpt1973145852
- Mahic M, Che X, Susser E, Levin B, Reichborn-Kjennerud T, Magnus P, Stoltenberg C, Chauhan L, Briese T, Bresnahan M, Surén P, Hornig M, Mjaaland S, Lipkin WI. 2017. Epidemiological and Serological Investigation into the Role of Gestational Maternal Influenza Virus Infection and Autism Spectrum Disorders. *mSphere* **2**:e00159-17. doi:10.1128/mSphere.00159-17
- Mangano GD, Riva A, Fontana A, Salpietro V, Mangano GR, Nobile G, Orsini A, Iacomino M, Battini R, Astrea G, Striano P, Nardello R. 2022. De novo GRIN2A variants associated with epilepsy and autism and literature review. *Epilepsy Behav EB* **129**:108604. doi:10.1016/j.yebeh.2022.108604
- Margolis EB, Toy B, Himmels P, Morales M, Fields HL. 2012. Identification of Rat Ventral Tegmental Area GABAergic Neurons. *PLoS ONE* **7**:e42365. doi:10.1371/journal.pone.0042365
- Marín O. 2012. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* **13**:107–120. doi:10.1038/nrn3155
- Markowitz PI. 1983. Autism in a child with congenital cytomegalovirus infection. *J Autism Dev Disord* **13**:249–253. doi:10.1007/BF01531564
- Massi L, Elezgarai I, Puente N, Reguero L, Grandes P, Manzoni OJ, Georges F. 2008. Cannabinoid Receptors in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis Control Cortical Excitation of Midbrain Dopamine Cells In Vivo. *J Neurosci* **28**:10496–10508. doi:10.1523/JNEUROSCI.2291-08.2008

- Matosin N, Fernandez-Enright F, Lum JS, Engel M, Andrews JL, Gassen NC, Wagner KV, Schmidt MV, Newell KA. 2016. Molecular evidence of synaptic pathology in the CA1 region in schizophrenia. *Npj Schizophr* **2**:1–8. doi:10.1038/npjSchz.2016.22
- McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. 2019. The IL-17 family of cytokines in health and disease. *Immunity* **50**:892–906. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.021
- McGovern N, Shin A, Low G, Low D, Duan K, Yao LJ, Msallam R, Low I, Shadan NB, Sumatoh HR, Soon E, Lum J, Mok E, Hubert S, See P, Kunxiang EH, Lee YH, Janela B, Choolani M, Mattar CNZ, Fan Y, Lim TKH, Chan DKH, Tan K-K, Tam JKC, Schuster C, Elbe-Bürger A, Wang X, Bigley V, Collin M, Haniffa M, Schlitzer A, Poidinger M, Albani S, Larbi A, Newell EW, Chan JKY, Ginhoux F. 2017. Human fetal dendritic cells promote prenatal T-cell immune suppression through arginase-2. *Nature* **546**:662–666. doi:10.1038/nature22795
- McGrath JJ, Pemberton MR, Welham JL, Murray RM. 1994. Schizophrenia and the influenza epidemics of 1954, 1957 and 1959: A southern hemisphere study. *Schizophr Res* **14**:1–8. doi:10.1016/0920-9964(94)90002-7
- McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL, Henkel GW, Vestal DJ, Baribault H, Klemsz M, Feeney AJ, Wu GE, Paige CJ, Maki RA. 1996. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J* **15**:5647–5658. doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb00949.x
- Mednick SA, Huttunen MO, Machon RA. 1994. Prenatal Influenza Infections and Adult Schizophrenia. *Schizophr Bull* **20**:263–267. doi:10.1093/schbul/20.2.263
- Mednick SA, Machon RA, Huttunen MO, Bonett D. 1988. Adult Schizophrenia Following Prenatal Exposure to an Influenza Epidemic. *Arch Gen Psychiatry* **45**:189–192. doi:10.1001/archpsyc.1988.01800260109013
- Meltzer HY, Matsubara S, Lee JC. 1989. Classification of Typical and Atypical Antipsychotic Drugs on the Basis of Dopamine , D-2 and Serotonin₂ pK Values. *J Pharmacol Exp Ther* **251**:238–246.
- Menassa DA, Gomez-Nicola D. 2018. Microglial Dynamics During Human Brain Development. *Front Immunol* **9**:1014. doi:10.3389/fimmu.2018.01014
- Meng G, Liang Y, Sarsfield S, Jiang W, Lu R, Dudman JT, Aponte Y, Ji N. 2019. High-throughput synapse-resolving two-photon fluorescence microendoscopy for deep-brain volumetric imaging in vivo. *eLife* **8**:e40805. doi:10.7554/eLife.40805
- Menninger K. 1926. Influenza and schizophrenia. An analysis of post-influenzal “dementia precox,” as of 1918, and five years later further studies of the psychiatric aspects of influenza. *Am J Psychiatry* **5**. doi:10.1176/ajp.82.4.469
- Meyer JH, Cervenka S, Kim M-J, Kreisl WC, Henter ID, Innis RB. 2020. Neuroinflammation in psychiatric disorders: PET imaging and promising new targets. *Lancet Psychiatry* **7**:1064–1074. doi:10.1016/S2215-0366(20)30255-8

- Meyer U. 2019. Neurodevelopmental Resilience and Susceptibility to Maternal Immune Activation. *Trends Neurosci* **42**:793–806. doi:10.1016/j.tins.2019.08.001
- Meyer U. 2006. The Time of Prenatal Immune Challenge Determines the Specificity of Inflammation-Mediated Brain and Behavioral Pathology. *J Neurosci* **26**:4752–4762. doi:10.1523/JNEUROSCI.0099-06.2006
- Meyer U, Murray PJ, Urwyler A, Yee BK, Schedlowski M, Feldon J. 2008. Adult behavioral and pharmacological dysfunctions following disruption of the fetal brain balance between pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory signaling. *Mol Psychiatry* **13**:208–221. doi:10.1038/sj.mp.4002042
- Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B. 2011. Meta-Analysis of Cytokine Alterations in Schizophrenia: Clinical Status and Antipsychotic Effects. *Biol Psychiatry* **70**:663–671. doi:10.1016/j.biopsych.2011.04.013
- Minten C, Terry R, Deffrasnes C, King NJC, Campbell IL. 2012. IFN Regulatory Factor 8 Is a Key Constitutive Determinant of the Morphological and Molecular Properties of Microglia in the CNS. *PLoS ONE* **7**:e49851. doi:10.1371/journal.pone.0049851
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **78**:189–225. doi:10.1152/physrev.1998.78.1.189
- Miyamoto A, Wake H, Ishikawa AW, Eto K, Shibata K, Murakoshi H, Koizumi S, Moorhouse AJ, Yoshimura Y, Nabekura J. 2016. Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nat Commun* **7**:12540. doi:10.1038/ncomms12540
- Miyaoka T, Wake R, Furuya M, Liaury K, Ieda M, Kawakami K, Tsuchie K, Taki M, Ishihara K, Araki T, Horiguchi J. 2012. Minocycline as adjunctive therapy for patients with unipolar psychotic depression: An open-label study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **37**:222–226. doi:10.1016/j.pnpbp.2012.02.002
- Miyaoka T, Yasukawa R, Yasuda H, Hayashida M, Inagaki T, Horiguchi J. 2008. Minocycline as Adjunctive Therapy for Schizophrenia: An Open-Label Study. *Clin Neuropharmacol* **31**:287–292. doi:10.1097/WNF.0b013e3181593d45
- Mizuno T, Kawanokuchi J, Numata K, Suzumura A. 2003. Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system. *Brain Res* **979**:65–70. doi:10.1016/S0006-8993(03)02867-1
- Mondo E, Becker SC, Kautzman AG, Schifferer M, Baer CE, Chen J, Huang EJ, Simons M, Schafer DP. 2020. A Developmental Analysis of Juxtavascular Microglia Dynamics and Interactions with the Vasculature. *J Neurosci* **40**:6503–6521. doi:10.1523/JNEUROSCI.3006-19.2020
- Monier A, Adle-Biassette H, Delezoide A-L, Evrard P, Gressens P, Verney C. 2007. Entry and Distribution of Microglial Cells in Human Embryonic and Fetal Cerebral Cortex: *J Neuropathol Exp Neurol* **66**:372–382. doi:10.1097/nen.0b013e3180517b46
- Montanari M, Martella G, Bonsi P, Meringolo M. 2022. Autism Spectrum Disorder: Focus on Glutamatergic Neurotransmission. *Int J Mol Sci* **23**:3861. doi:10.3390/ijms23073861

- Morales M, Margolis EB. 2017. Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nat Rev Neurosci* **18**:73–85. doi:10.1038/nrn.2016.165
- Morgan JT, Chana G, Pardo CA, Achim C, Semendeferi K, Buckwalter J, Courchesne E, Everall IP. 2010. Microglial Activation and Increased Microglial Density Observed in the Dorsolateral Prefrontal Cortex in Autism. *Biol Psychiatry* **68**:368–376. doi:10.1016/j.biopsych.2010.05.024
- Mortensen PB, Pedersen CB, Hougaard DM, Nørgaard-Petersen B, Mors O, Børghlum AD, Yolken RH. 2010. A Danish National Birth Cohort study of maternal HSV-2 antibodies as a risk factor for schizophrenia in their offspring. *Schizophr Res* **122**:257–263. doi:10.1016/j.schres.2010.06.010
- Murugan M, Sivakumar V, Lu J, Ling E-A, Kaur C. 2011. Expression of N-methyl D-aspartate receptor subunits in amoeboid microglia mediates production of nitric oxide via NF- κ B signaling pathway and oligodendrocyte cell death in hypoxic postnatal rats. *Glia* **59**:521–539. doi:10.1002/glia.21121
- Muschamp JW, Hollander JA, Thompson JL, Voren G, Hassinger LC, Onvani S, Kamenecka TM, Borgland SL, Kenny PJ, Carlezon WA. 2014. Hypocretin (orexin) facilitates reward by attenuating the antireward effects of its cotransmitter dynorphin in ventral tegmental area. *Proc Natl Acad Sci* **111**. doi:10.1073/pnas.1315542111
- Nagaeva E, Zubarev I, Bengtsson Gonzales C, Forss M, Nikouei K, de Miguel E, Elsilä L, Linden A-M, Hjerling-Leffler J, Augustine GJ, Korpi ER. 2020. Heterogeneous somatostatin-expressing neuron population in mouse ventral tegmental area. *eLife* **9**:e59328. doi:10.7554/eLife.59328
- Nair-Roberts RG, Chatelain-Badie SD, Benson E, White-Cooper H, Bolam JP, Ungless MA. 2008. Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience* **152**:1024–1031. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.01.046
- Nakamura K, Sekine Y, Ouchi Y, Tsujii M, Yoshikawa E, Futatsubashi M, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Iwata Y, Suzuki K, Matsuzaki H, Suda S, Sugiyama T, Takei N, Mori N. 2010. Brain Serotonin and Dopamine Transporter Bindings in Adults With High-Functioning Autism. *Arch Gen Psychiatry* **67**:59. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2009.137
- Nakanishi M, Niidome T, Matsuda S, Akaike A, Kihara T, 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. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05309.x
- Nanhong L, Takahiro T, Yong P, Xavier AL, Goldman SA, Nedergaard M. 2016. Purinergic receptor P2RY12-dependent microglial closure of the injured blood–brain barrier. *PNAS*. doi:10.1073/pnas.1520398113
- Navascués J, Calvente R, Marín-Teva JL, Cuadros MA. 2000. Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system. *An Acad Bras Ciênc* **72**:91–102. doi:10.1590/S0001-37652000000100013

- Nayak D, Roth TL, McGavern DB. 2014. Microglia Development and Function. *Annu Rev Immunol* **32**:367–402. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120240
- Needleman LA, McAllister AK. 2012. The major histocompatibility complex and autism spectrum disorder. *Dev Neurobiol* **72**:1288–1301. doi:10.1002/dneu.22046
- Nelander J, Hebsgaard JB, Parmar M. 2009. Organization of the human embryonic ventral mesencephalon. *Gene Expr Patterns* **9**:555–561. doi:10.1016/j.gep.2009.10.002
- Neu N, Duchon J, Zachariah P. 2015. TORCH Infections. *Clin Perinatol* **42**:77–103. doi:10.1016/j.clp.2014.11.001
- Neuhoff H, Neu A, Liss B, Roeper J. 2002. Ih Channels Contribute to the Different Functional Properties of Identified Dopaminergic Subpopulations in the Midbrain. *J Neurosci* **22**:1290–1302. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-04-01290.2002
- Nguyen C, Mondoloni S, Borgne TL, Centeno I, Come M, Jehl J, Solié C, Reynolds LM, Cuttoli RD, Tolu S, Valverde S, Didiene S, Hanneke B, Fiancette J-F, Pons S, Maskos U, Deroche-Gamonet V, Dalkara D, Hardelin J-P, Mourot A, Marti F, Faure P. 2021. Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala dopamine pathway to promote anxiety. *Neuron* **109**:2604. doi:10.1016/j.neuron.2021.06.013
- Nieh EH, Matthews GA, Allsop SA, Presbrey KN, Leppla CA, Wichmann R, Neve R, Wildes CP, Tye KM. 2015. Decoding Neural Circuits that Control Compulsive Sucrose Seeking. *Cell* **160**:528–541. doi:10.1016/j.cell.2015.01.003
- Nieh EH, Vander Weele CM, Matthews GA, Presbrey KN, Wichmann R, Leppla CA, Izadmehr EM, Tye KM. 2016. Inhibitory Input from the Lateral Hypothalamus to the Ventral Tegmental Area Disinhibits Dopamine Neurons and Promotes Behavioral Activation. *Neuron* **90**:1286–1298. doi:10.1016/j.neuron.2016.04.035
- Nieminen-von Wendt TS, Metsähonkala L, Kulomäki TA, Aalto S, Autti TH, Vanhala R, Eskola O, Bergman J, Hietala JA, von Wendt LO. 2004. Increased presynaptic dopamine function in Asperger syndrome: *NeuroReport* **15**:757–760. doi:10.1097/00001756-200404090-00003
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. 2005. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science* **308**:1314–1318. doi:10.1126/science.1110647
- Nisar S, Bhat AA, Masoodi T, Hashem S, Akhtar S, Ali TA, Amjad S, Chawla S, Bagga P, Frenneaux MP, Reddy R, Fakhro K, Haris M. 2022. Genetics of glutamate and its receptors in autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry* **27**:2380–2392. doi:10.1038/s41380-022-01506-w
- Nishihara T, Tanaka J, Sekiya K, Nishikawa Y, Abe N, Hamada T, Kitamura S, Ikemune K, Ochi S, Choudhury ME, Yano H, Yorozuya T. 2020. Chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats causes different activation modes of microglia between the anterior and posterior horns of the spinal cord. *Neurochem Int* **134**:104672. doi:10.1016/j.neuint.2020.104672

- Noda M, Nakanishi H, Nabekura J, Akaike N. 2000. AMPA–Kainate Subtypes of Glutamate Receptor in Rat Cerebral Microglia. *J Neurosci* **20**:251–258. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-01-00251.2000
- Oakman S, Faris P, Kerr P, Cozzari C, Hartman B. 1995. Distribution of pontomesencephalic cholinergic neurons projecting to substantia nigra differs significantly from those projecting to ventral tegmental area. *J Neurosci* **15**:5859–5869. doi:10.1523/JNEUROSCI.15-09-05859.1995
- O’Callaghan E, Sham P, Takei N, Glover G, Murray RM. 1991. Schizophrenia after prenatal exposure to 1957 A2 influenza epidemic. *The Lancet* **337**.
- O’Callaghan E, Sham PC, Takei N, Murray G, Glover G, Hare EH, Murray RM. 1994. The Relationship of Schizophrenic Births to 16 Infectious Diseases. *Br J Psychiatry* **165**:353–356. doi:10.1192/bjp.165.3.353
- Ohira K. 2019. Dopamine stimulates differentiation and migration of cortical interneurons. *Biochem Biophys Res Commun* **512**:577–583. doi:10.1016/j.bbrc.2019.03.105
- Okubo Y, Suhara T, Suzuki K, Kobayashi K, Inoue O, Terasaki O, Someya Y, Sassa T, Sudo Y, Matsushima E, Iyo M, Tateno Y, Toru M. 1997. Decreased prefrontal dopamine D1 receptors in schizophrenia revealed by PET. *Nature* **385**:634–636. doi:10.1038/385634a0
- Olds J, Milner P. 1954. POSITIVE REINFORCEMENT PRODUCED BY ELECTRICAL STIMULATION OF SEPTAL AREA AND OTHER REGIONS OF RAT BRAIN’. *J Comp Physiol Psychol* **47**:419–427.
- Olson VG, Nestler EJ. 2007. Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat. *Synapse* **61**:87–95. doi:10.1002/syn.20345
- Omelchenko N, Sesack SR. 2009. Ultrastructural analysis of local collaterals of rat ventral tegmental area neurons: GABA phenotype and synapses onto dopamine and GABA cells. *Synapse* **63**:895–906. doi:10.1002/syn.20668
- Ono Y, Nakatani T, Sakamoto Y, Mizuhara E, Minaki Y, Kumai M, Hamaguchi A, Nishimura M, Inoue Y, Hayashi H, Takahashi J, Imai T. 2007. Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location: midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells. *Development* **134**:3213–3225. doi:10.1242/dev.02879
- Onwordi EC, Half EF, Whitehurst T, Mansur A, Cotel M-C, Wells L, Creaney H, Bonsall D, Rogdaki M, Shatalina E, Reis Marques T, Rabiner EA, Gunn RN, Natesan S, Vernon AC, Howes OD. 2020. Synaptic density marker SV2A is reduced in schizophrenia patients and unaffected by antipsychotics in rats. *Nat Commun* **11**:246. doi:10.1038/s41467-019-14122-0
- Paidassi H, Tacnet-Delorme P, Garlatti V, Darnault C, Ghebrehiwet B, Gaboriaud C, Arlaud GJ, Frachet P. 2008. C1q Binds Phosphatidylserine and Likely Acts as a Multiligand-Bridging Molecule in Apoptotic Cell Recognition. *J Immunol* **180**:2329–2338. doi:10.4049/jimmunol.180.4.2329

- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross CT. 2011. Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science* **333**:1456–1458. doi:10.1126/science.1202529
- Paolicelli RC, Ferretti MT. 2017. Function and Dysfunction of Microglia during Brain Development: Consequences for Synapses and Neural Circuits. *Front Synaptic Neurosci* **9**:9. doi:10.3389/fnsyn.2017.00009
- Paolicelli RC, Sierra A, Stevens B, Tremblay M-E, Aguzzi A, Ajami B, Amit I, Audinat E, Bechmann I, Bennett M, Bennett F, Bessis A, Biber K, Bilbo S, Blurton-Jones M, Boddeke E, Brites D, Brône B, Brown GC, Butovsky O, Carson MJ, Castellano B, Colonna M, Cowley SA, Cunningham C, Davalos D, De Jager PL, de Strooper B, Denes A, Eggen BJL, Eyo U, Galea E, Garel S, Ginhoux F, Glass CK, Gokce O, Gomez-Nicola D, González B, Gordon S, Graeber MB, Greenhalgh AD, Gressens P, Greter M, Gutmann DH, Haass C, Heneka MT, Heppner FL, Hong S, Hume DA, Jung S, Kettenmann H, Kipnis J, Koyama R, Lemke G, Lynch M, Majewska A, Malcangio M, Malm T, Mancuso R, Masuda T, Matteoli M, McColl BW, Miron VE, Molofsky AV, Monje M, Mracsko E, Nadjjar A, Neher JJ, Neniskyte U, Neumann H, Noda M, Peng B, Peri F, Perry VH, Popovich PG, Pridans C, Priller J, Prinz M, Ragozzino D, Ransohoff RM, Salter MW, Schaefer A, Schaefer DP, Schwartz M, Simons M, Smith CJ, Streit WJ, Tay TL, Tsai L-H, Verkhratsky A, von Bernhardi R, Wake H, Wittamer V, Wolf SA, Wu L-J, Wyss-Coray T. 2022. Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron* **110**:3458–3483. doi:10.1016/j.neuron.2022.10.020
- Pardo CA, Buckley A, Thurm A, Lee L-C, Azhagiri A, Neville DM, Swedo SE. 2013. A pilot open-label trial of minocycline in patients with autism and regressive features. *J Neurodev Disord* **5**:9. doi:10.1186/1866-1955-5-9
- Paribello C, Tao L, Folino A, Berry-Kravis E, Tranfaglia M, Ethell IM, Ethell DW. 2010. Open-label add-on treatment trial of minocycline in fragile X syndrome. *BMC Neurol* **10**:91. doi:10.1186/1471-2377-10-91
- Park J, Choi Y, Jung E, Lee S, Sohn J, Chung W. 2021. Microglial MERTK eliminates phosphatidylserine-displaying inhibitory post-synapses. *EMBO J* **40**. doi:10.15252/embj.2020107121
- Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR, Gan W-B. 2013. Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell* **155**:1596–1609. doi:10.1016/j.cell.2013.11.030
- Pascual O, Ben Achour S, Rostaing P, Triller A, Bessis A. 2012. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci* **109**. doi:10.1073/pnas.1111098109
- Pavál D. 2017. A Dopamine Hypothesis of Autism Spectrum Disorder. *Dev Neurosci* **39**:355–360. doi:10.1159/000478725

- Perry VH, Hume DA, Gordon S. 1985. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* **15**:313–326. doi:10.1016/0306-4522(85)90215-5
- Perry VH, O'Connor V. 2010. The Role of Microglia in Synaptic Stripping and Synaptic Degeneration: A Revised Perspective. *ASN Neuro* **2**:AN20100024. doi:10.1042/AN20100024
- Pfrieger FW, Barres BA. 1997. Synaptic Efficacy Enhanced by Glial Cells in Vitro. *Science* **277**:1684–1687. doi:10.1126/science.277.5332.1684
- Pickel VM, Towle AC, Joh TH, Chan J. 1988. Gamma-Aminobutyric Acid in the Medial Rat Nucleus Accumbens: Ultrastructural Localization in Neurons Receiving Monosynaptic Input From Catecholaminergic Merents. *J Comp Neurol* 1–14.
- Pont-Lezica L, Béchade C, Belarif-Cantaut Y, Pascual O, Bessis A. 2011. Physiological roles of microglia during development. *J Neurochem* **119**:901–908. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07504.x
- Pont-Lezica L, Beumer W, Colasse S, Drexhage H, Versnel M, Bessis A. 2014. Microglia shape corpus callosum axon tract fasciculation: functional impact of prenatal inflammation. *Eur J Neurosci* **39**:1551–1557. doi:10.1111/ejn.12508
- Potvin S, Stip E, Sepehry AA, Gendron A, Bah R, Kouassi E. 2008. Inflammatory Cytokine Alterations in Schizophrenia: A Systematic Quantitative Review. *Biol Psychiatry* **63**:801–808. doi:10.1016/j.biopsych.2007.09.024
- Prakash N, Brodski C, Naserke T, Puelles E, Gogoi R, Hall A, Panhuysen M, Echevarria D, Sussel L, Weisenhorn DMV, Martinez S, Arenas E, Simeone A, Wurst W. 2006. A Wnt1-regulated genetic network controls the identity and fate of midbrain-dopaminergic progenitors in vivo. *Development* **133**:89–98. doi:10.1242/dev.02181
- Prakash N, Wurst W. 2006. Genetic networks controlling the development of midbrain dopaminergic neurons: Genetic control of midbrain dopaminergic neuron development. *J Physiol* **575**:403–410. doi:10.1113/jphysiol.2006.113464
- Presumey J, Bialas AR, Carroll MC. 2017. Complement System in Neural Synapse Elimination in Development and Disease *Advances in Immunology*. Elsevier. pp. 53–79. doi:10.1016/bs.ai.2017.06.004
- Prinz M, Jung S, Priller J. 2019. Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell* **179**:292–311. doi:10.1016/j.cell.2019.08.053
- Prinz M, Priller J. 2014. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci* **15**:300–312. doi:10.1038/nrn3722
- Purcell SM, Moran JL, Fromer M, Ruderfer D, Solovieff N, Roussos P, O'Dushlaine C, Chambert K, Bergen SE, Kähler A, Duncan L, Stahl E, Genovese G, Fernández E, Collins MO, Komiyama NH, Choudhary JS, Magnusson PKE, Banks E, Shakir K, Garimella K, Fennell T, DePristo M, Grant SGN, Haggarty SJ, Gabriel S, Scolnick EM, Lander ES, Hultman CM, Sullivan PF, McCarroll SA, Sklar P. 2014. A polygenic

- burden of rare disruptive mutations in schizophrenia. *Nature* **506**:185–190. doi:10.1038/nature12975
- Qi J, Zhang S, Wang H-L, Wang H, de Jesus Aceves Buendia J, Hoffman AF, Lupica CR, Seal RP, Morales M. 2014. A glutamatergic reward input from the dorsal raphe to ventral tegmental area dopamine neurons. *Nat Commun* **5**:5390. doi:10.1038/ncomms6390
- Racicot K, Mor G. 2017. Risks associated with viral infections during pregnancy. *J Clin Invest* **127**:1591–1599. doi:10.1172/JCI87490
- Recasens M, Almolda B, Pérez-Clausell J, Campbell IL, González B, Castellano B. 2021. Chronic exposure to IL-6 induces a desensitized phenotype of the microglia. *J Neuroinflammation* **18**:31. doi:10.1186/s12974-020-02063-1
- Reemst K, Noctor SC, Lucassen PJ, Hol EM. 2016. The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. *Front Hum Neurosci* **10**. doi:10.3389/fnhum.2016.00566
- Rice D, Jr SB. 2000. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. *Environ Health Perspect* **108**.
- Rigato C, Buckinx R, Le-Corronc H, Rigo JM, Legendre P. 2011. Pattern of invasion of the embryonic mouse spinal cord by microglial cells at the time of the onset of functional neuronal networks. *Glia* **59**:675–695. doi:10.1002/glia.21140
- Ronaldson PT, Davis TP. 2020. Regulation of blood–brain barrier integrity by microglia in health and disease: A therapeutic opportunity. *J Cereb Blood Flow Metab*. doi:10.1177/0271678X20951995
- Root DH, Melendez RI, Zaborszky L, Napier TC. 2015. The ventral pallidum: Subregion-specific functional anatomy and roles in motivated behaviors. *Prog Neurobiol* **130**:29–70. doi:10.1016/j.pneurobio.2015.03.005
- Rothaug M, Becker-Pauly C, Rose-John S. 2016. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* **1863**:1218–1227. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.03.018
- Ruan C, Elyaman W. 2022. A New Understanding of TMEM119 as a Marker of Microglia. *Front Cell Neurosci* **16**:902372. doi:10.3389/fncel.2022.902372
- Russo SJ, Nestler EJ. 2013. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci* **14**:609–625. doi:10.1038/nrn3381
- Rutter M. 2000. Genetic Studies of Autism: From the 1970s into the Millennium. *J Abnorm Child Psychol*.
- Ryu JK, McLarnon JG. 2006. Minocycline or iNOS inhibition block 3-nitrotyrosine increases and blood–brain barrier leakiness in amyloid beta-peptide-injected rat hippocampus. *Exp Neurol* **198**:552–557. doi:10.1016/j.expneurol.2005.12.016
- Salamanca L, Mechawar N, Murai KK, Balling R, Bouvier DS, Skupin A. 2019. MIC-MAC: An automated pipeline for high-throughput characterization and classification of three-

- dimensional microglia morphologies in mouse and human postmortem brain samples. *Glia* **67**:1496–1509. doi:10.1002/glia.23623
- Santa-Cecília FV, Socias B, Ouidja MO, Sepulveda-Diaz JE, Acuña L, Silva RL, Michel PP, Del-Bel E, Cunha TM, Raisman-Vozari R. 2016. Doxycycline Suppresses Microglial Activation by Inhibiting the p38 MAPK and NF-κB Signaling Pathways. *Neurotox Res* **29**:447–459. doi:10.1007/s12640-015-9592-2
- Sarkar C, Basu B, Chakroborty D, Dasgupta PS, Basu S. 2010. The immunoregulatory role of dopamine: An update. *Brain Behav Immun* **24**:525–528. doi:10.1016/j.bbi.2009.10.015
- Sarma JD, Ciric B, Marek R, Sadhukhan S, Caruso ML, Shafagh J, Fitzgerald DC, Shindler KS, Rostami A. 2009. Functional interleukin-17 receptor A is expressed in central nervous system glia and upregulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* **6**:14. doi:10.1186/1742-2094-6-14
- Satoh J, Kino Y, Yanaizu M, Ishida T, Saito Y. 2019. Microglia express TMEM119 in the brains of Nasu-Hakola disease. *Intractable Rare Dis Res* **8**:260–265. doi:10.5582/irdr.2019.01123
- Saucedo-Cardenas O, Quintana-Hau JD, Le W-D, Smidt MP, Cox JJ, De Mayo F, Burbach JPH, Conneely OM. 1998. Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci* **95**:4013–4018. doi:10.1073/pnas.95.7.4013
- Sawaguchi T, Goldman-Rakic PS. 1991. D1 Dopamine Receptors in Prefrontal Cortex: Involvement in Working Memory. *Science* **251**.
- Saxen L, Hjelt L, Sjostedt JE, Hakosalo J, Hakosalo H. 1960. Asian influenza during pregnancy and congenital malformations. *Acta Pathol Microbiol Scand* **49**:114–126. doi:10.1111/j.1699-0463.1960.tb01121.x
- Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B. 2012. Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron* **74**:691–705. doi:10.1016/j.neuron.2012.03.026
- Schalbetter SM, von Arx AS, Cruz-Ochoa N, Dawson K, Ivanov A, Mueller FS, Lin H-Y, Amport R, Mildenerger W, Mattei D, Beule D, Földy C, Greter M, Notter T, Meyer U. 2022. Adolescence is a sensitive period for prefrontal microglia to act on cognitive development. *Sci Adv*.
- Schalbroeck R, de Geus-Oei L-F, Selten J-P, Yaquib M, Schrantee A, van Amelsvoort T, Booij J, van Velden FHP. 2021a. Cerebral [18F]-FDOPA Uptake in Autism Spectrum Disorder and Its Association with Autistic Traits. *Diagnostics* **11**:2404. doi:10.3390/diagnostics11122404
- Schalbroeck R, van Velden FHP, de Geus-Oei L-F, Yaquib M, van Amelsvoort T, Booij J, Selten J-P. 2021b. Striatal dopamine synthesis capacity in autism spectrum disorder and its relation with social defeat: an [18F]-FDOPA PET/CT study. *Transl Psychiatry* **11**:47. doi:10.1038/s41398-020-01174-w

- Schizophrenia Psychiatric GWAS Consortium, Ripke S, Sanders AR, Kendler KS, Levinson DF, Sklar P, Holmans PA, Lin D-Y, Duan J, Ophoff RA, Andreassen OA, Scolnick E, Cichon S, St. Clair D, Corvin A, Gurling H, Werge T, Rujescu D, Blackwood DHR, Pato CN, Malhotra AK, Purcell S, Dudbridge F, Neale BM, Rossin L, Visscher PM, Posthuma D, Ruderfer DM, Fanous A, Stefansson H, Steinberg S, Mowry BJ, Golimbet V, De Hert M, Jönsson EG, Bitter I, Pietiläinen OPH, Collier DA, Tosato S, Agartz I, Albus M, Alexander M, Amdur RL, Amin F, Bass N, Bergen SE, Black DW, Børglum AD, Brown MA, Bruggeman R, Buccola NG, Byerley WF, Cahn W, Cantor RM, Carr VJ, Catts SV, Choudhury K, Cloninger CR, Cormican P, Craddock N, Danoy PA, Datta S, de Haan L, Demontis D, Dikeos D, Djurovic S, Donnelly P, Donohoe G, Duong L, Dwyer S, Fink-Jensen A, Freedman R, Freimer NB, Friedl M, Georgieva L, Giegling I, Gill M, Glenthøj B, Godard S, Hamshere M, Hansen M, Hansen T, Hartmann AM, Henskens FA, Hougaard DM, Hultman CM, Ingason A, Jablensky AV, Jakobsen KD, Jay M, Jürgens G, Kahn RS, Keller MC, Kenis G, Kenny E, Kim Y, Kirov GK, Konnerth H, Konte B, Krabbendam L, Krasucki R, Lasseter VK, Laurent C, Lawrence J, Lencz T, Lerer FB, Liang K-Y, Lichtenstein P, Lieberman JA, Linszen DH, Lönnqvist J, Loughland CM, Maclean AW, Maher BS, Maier W, Mallet J, Malloy P, Mattheisen M, Mattingsdal M, McGhee KA, McGrath JJ, McIntosh A, McLean DE, McQuillin A, Melle I, Michie PT, Milanova V, Morris DW, Mors O, Mortensen PB, Moskvina V, Muglia P, Myin-Germeys I, Nertney DA, Nestadt G, Nielsen J, Nikolov I, Nordentoft M, Norton N, Nöthen MM, O’Dushlaine CT, Olincy A, Olsen L, O’Neill FA, Ørntoft TF, Owen MJ, Pantelis C, Papadimitriou G, Pato MT, Peltonen L, Petursson H, Pickard B, Pimm J, Pulver AE, Puri V, Quedsted D, Quinn EM, Rasmussen HB, Réthelyi JM, Ribble R, Rietschel M, Riley BP, Ruggeri M, Schall U, Schulze TG, Schwab SG, Scott RJ, Shi J, Sigurdsson E, Silverman JM, Spencer CCA, Stefansson K, Strange A, Strengman E, Stroup TS, Suvisaari J, Terenius L, Thirumalai S, Thygesen JH, Timm S, Toncheva D, van den Oord E, van Os J, van Winkel R, Veldink J, Walsh D, Wang AG, Wiersma D, Wildenauer DB, Williams HJ, Williams NM, Wormley B, Zammit S, Sullivan PF, O’Donovan MC, Daly MJ, Gejman PV. 2011. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat Genet* **43**:969–976. doi:10.1038/ng.940
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. 2014. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* **511**:421–427. doi:10.1038/nature13595
- Schuldiner S, Shirvan A, Linial M. 1995. Vesicular neurotransmitter transporters: from bacteria to humans. *Physiol Rev* **75**:369–392. doi:10.1152/physrev.1995.75.2.369
- Schulz C, Perdiguero EG, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SEW, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F. 2012. A Lineage of Myeloid Cells Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells. *Science* **336**:86–90. doi:10.1126/science.1219179
- Scott-Hewitt N, Perrucci F, Morini R, Erreni M, Mahoney M, Witkowska A, Carey A, Faggiani E, Schuetz LT, Mason S, Tamborini M, Bizzotto M, Passoni L, Filipello F, Jahn R, Stevens B, Matteoli M. 2020. Local externalization of phosphatidylserine mediates developmental synaptic pruning by microglia. *EMBO J* **39**. doi:10.15252/emboj.2020105380

- Scott-Van Zeeland AA, Dapretto M, Ghahremani DG, Poldrack RA, Bookheimer SY. 2010. Reward processing in autism. *Autism Res* n/a-n/a. doi:10.1002/aur.122
- Seeman P, Kapur S. 2000. Schizophrenia: More dopamine, more D₂ receptors. *Proc Natl Acad Sci* **97**:7673–7675. doi:10.1073/pnas.97.14.7673
- Segawa K, Nagata S. 2015. An Apoptotic ‘Eat Me’ Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends Cell Biol* **25**:639–650. doi:10.1016/j.tcb.2015.08.003
- Sekar A, Bialas AR, de Rivera H, Davis A, Hammond TR, Kamitaki N, Tooley K, Presumey J, Baum M, Van Doren V, Genovese G, Rose SA, Handsaker RE, Daly MJ, Carroll MC, Stevens B, McCarroll SA. 2016. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature* **530**:177–183. doi:10.1038/nature16549
- Sellgren CM, Gracias J, Watmuff B, Biag JD, Thanos JM, Whittredge PB, Fu T, Worringer K, Brown HE, Wang J, Kaykas A, Karmacharya R, Goold CP, Sheridan SD, Perlis RH. 2019. Increased synapse elimination by microglia in schizophrenia patient-derived models of synaptic pruning. *Nat Neurosci* **22**:374–385. doi:10.1038/s41593-018-0334-7
- Selten J-P, Frissen A, Lensvelt-Mulders G, Morgan VA. 2010. Schizophrenia and 1957 Pandemic of Influenza: Meta-analysis. *Schizophr Bull* **36**:219–228. doi:10.1093/schbul/sbp147
- Selten J-PCJ, Slaets JPJ. 1994. Evidence Against Maternal Influenza as a Risk Factor for Schizophrenia. *Br J Psychiatry* **164**:674–676. doi:10.1192/bjp.164.5.674
- Sesack SR, Grace AA. 2010. Cortico-Basal Ganglia Reward Network: Microcircuitry. *Neuropsychopharmacology* **35**:27–47. doi:10.1038/npp.2009.93
- Shao W, Zhang S, Tang M, Zhang X, Zhou Z, Yin Y, Zhou Q, Huang Y, Liu Y, Wawrousek E, Chen T, Li S, Xu M, Zhou Jiang-ning, Hu G, Zhou Jia-wei. 2013. Suppression of neuroinflammation by astrocytic dopamine D2 receptors via α B-crystallin. *Nature* **494**:90–94. doi:10.1038/nature11748
- Shigemori T, Sakai A, Takumi T, Itoh Y, Suzuki H. 2015. Altered Microglia in the Amygdala Are Involved in Anxiety-related Behaviors of a Copy Number Variation Mouse Model of Autism. *J Nippon Med Sch Nippon Ika Daigaku Zasshi* **82**:92–99. doi:10.1272/jnms.82.92
- Sierra A, de Castro F, del Río-Hortega J, Rafael Iglesias-Rozas J, Garrosa M, Kettenmann H. 2016. The “Big-Bang” for modern glial biology: Translation and comments on Pio del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia* **64**:1801–1840. doi:10.1002/glia.23046
- Sierra A, Encinas JM, Deudero JJP, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M. 2010. Microglia Shape Adult Hippocampal Neurogenesis through Apoptosis-Coupled Phagocytosis. *Cell Stem Cell* **7**:483–495. doi:10.1016/j.stem.2010.08.014

- Singh T, Poterba T, Curtis D, Akil H, Al Eissa M, Barchas JD, Bass N, Bigdeli TB, Breen G, Bromet EJ, Buckley PF, Bunney WE, Bybjerg-Grauholm J, Byerley WF, Chapman SB, Chen WJ, Churchhouse C, Craddock N, Cusick CM, DeLisi L, Dodge S, Escamilla MA, Eskelinen S, Fanous AH, Faraone SV, Fiorentino A, Francioli L, Gabriel SB, Gage D, Gagliano Taliun SA, Ganna A, Genovese G, Glahn DC, Grove J, Hall M-H, Hämäläinen E, Heyne HO, Holi M, Hougaard DM, Howrigan DP, Huang H, Hwu H-G, Kahn RS, Kang HM, Karczewski KJ, Kirov G, Knowles JA, Lee FS, Lehrer DS, Lescai F, Malaspina D, Marder SR, McCarroll SA, McIntosh AM, Medeiros H, Milani L, Morley CP, Morris DW, Mortensen PB, Myers RM, Nordentoft M, O'Brien NL, Olivares AM, Ongur D, Ouwehand WH, Palmer DS, Paunio T, Quedsted D, Rapaport MH, Rees E, Rollins B, Satterstrom FK, Schatzberg A, Scolnick E, Scott LJ, Sharp SI, Sklar P, Smoller JW, Sobell JL, Solomonson M, Stahl EA, Stevens CR, Suvisaari J, Tiao G, Watson SJ, Watts NA, Blackwood DH, Børglum AD, Cohen BM, Corvin AP, Esko T, Freimer NB, Glatt SJ, Hultman CM, McQuillin A, Palotie A, Pato CN, Pato MT, Pulver AE, St. Clair D, Tsuang MT, Vawter MP, Walters JT, Werge TM, Ophoff RA, Sullivan PF, Owen MJ, Boehnke M, O'Donovan MC, Neale BM, Daly MJ. 2022. Rare coding variants in ten genes confer substantial risk for schizophrenia. *Nature* **604**:509–516. doi:10.1038/s41586-022-04556-w
- Singh VK, Jensen RL. 2003. Elevated levels of measles antibodies in children with autism. *Pediatr Neurol* **28**:292–294. doi:10.1016/S0887-8994(02)00627-6
- Singh VK, Lin SX, Yang VC. 1998. Serological association of measles virus and human herpesvirus-6 with brain autoantibodies in autism. *Clin Immunol Immunopathol* **89**:105–108. doi:10.1006/clin.1998.4588
- Smiley JF, Levey AI, Ciliax BJ, Goldman-Rakic PS. 1994. D1 dopamine receptor immunoreactivity in human and monkey cerebral cortex: Predominant and extrasynaptic localization in dendritic spines.
- Smith SEP, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH. 2007. Maternal Immune Activation Alters Fetal Brain Development through Interleukin-6. *J Neurosci* **27**:10695–10702. doi:10.1523/JNEUROSCI.2178-07.2007
- Smolders SM-T, Kessels S, Vanganswinkel T, Rigo J-M, Legendre P, Brône B. 2019. Microglia: Brain cells on the move. *Prog Neurobiol* **178**:101612. doi:10.1016/j.pneurobio.2019.04.001
- Sokolova D, Childs T, Hong S. 2021. Insight into the role of phosphatidylserine in complement-mediated synapse loss in Alzheimer's disease. *Fac Rev* **10**. doi:10.12703/r/10-19
- Solmi M, Veronese N, Thapa N, Facchini S, Stubbs B, Fornaro M, Carvalho AF, Correll CU. 2017. Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of minocycline in schizophrenia. *CNS Spectr* **22**:415–426. doi:10.1017/S1092852916000638
- Sorokin SP, Hoyt Jr. RF, Blunt DG, McNelly NA. 1992. Macrophage development: II. Early ontogeny of macrophage populations in brain, liver, and lungs of rat embryos as revealed by a lectin marker. *Anat Rec* **232**:527–550. doi:10.1002/ar.1092320410

- Squarzoni P, Oller G, Hoeffel G, Pont-Lezica L, Rostaing P, Low D, Bessis A, Ginhoux F, Garel S. 2014. Microglia Modulate Wiring of the Embryonic Forebrain. *Cell Rep* **8**:1271–1279. doi:10.1016/j.celrep.2014.07.042
- Srinivasan K, Friedman BA, Etxeberria A, Huntley MA, van der Brug MP, Foreman O, Paw JS, Modrusan Z, Beach TG, Serrano GE, Hansen DV. 2020. Alzheimer's Patient Microglia Exhibit Enhanced Aging and Unique Transcriptional Activation. *Cell Rep* **31**:107843. doi:10.1016/j.celrep.2020.107843
- Stence N, Waite M, Dailey ME. 2001. Dynamics of microglial activation: A confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia* **33**:256–266. doi:10.1002/1098-1136(200103)33:3<256::AID-GLIA1024>3.0.CO;2-J
- Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SWM, Barres BA. 2007. The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell* **131**:1164–1178. doi:10.1016/j.cell.2007.10.036
- Stopper CM, Tse MTL, Montes DR, Wiedman CR, Floresco SB. 2014. Overriding Phasic Dopamine Signals Redirects Action Selection during Risk/Reward Decision Making. *Neuron* **84**:177–189. doi:10.1016/j.neuron.2014.08.033
- Stubbs EG, Ash E, Williams CPS. 1984. Autism and congenital cytomegalovirus. *J Autism Dev Disord* **14**:183–189. doi:10.1007/BF02409660
- Stuber GD, Hnasko TS, Britt JP, Edwards RH, Bonci A. 2010. Dopaminergic Terminals in the Nucleus Accumbens But Not the Dorsal Striatum Corelease Glutamate. *J Neurosci* **30**:8229–8233. doi:10.1523/JNEUROSCI.1754-10.2010
- Südhof TC. 2012. The Presynaptic Active Zone. *Neuron*.
- Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. 2003. Schizophrenia as a Complex Trait: Evidence From a Meta-analysis of Twin Studies. *Arch Gen Psychiatry* **60**:1187. doi:10.1001/archpsyc.60.12.1187
- Sulzer D, Cragg SJ, Rice ME. 2016. Striatal dopamine neurotransmission: Regulation of release and uptake. *Basal Ganglia* **6**:123–148. doi:10.1016/j.baga.2016.02.001
- Sulzer D, Joyce MP, Lin L, Geldwert D, Haber SN, Hattori T, Rayport S. 1998. Dopamine Neurons Make Glutamatergic Synapses *In Vitro*. *J Neurosci* **18**:4588–4602. doi:10.1523/JNEUROSCI.18-12-04588.1998
- Supekar K, Uddin LQ, Khouzam A, Phillips J, Gaillard WD, Kenworthy LE, Yerys BE, Vaidya CJ, Menon V. 2013. Brain Hyperconnectivity in Children with Autism and its Links to Social Deficits. *Cell Rep* **5**:738–747. doi:10.1016/j.celrep.2013.10.001
- Susser E, Lin SP, Brown AS, Lumey LH, Erlenmeyer-Kimling L. 1994. No relation between risk of schizophrenia and prenatal exposure to influenza in Holland. *Am J Psychiatry* **151**:922–924. doi:10.1176/ajp.151.6.922
- Sutterland AL, Fond G, Kuin A, Koeter MWJ, Lutter R, van Gool T, Yolken R, Szoke A, Leboyer M, de Haan L. 2015. Beyond the association. *Toxoplasma gondii* in [228]

- schizophrenia, bipolar disorder, and addiction: systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand* **132**:161–179. doi:10.1111/acps.12423
- Suvisaari J, Haukka J, Tanskanen A, Hovi T, Lönnqvist J. 1999. Association Between Prenatal Exposure to Poliovirus Infection and Adult Schizophrenia. *Am J Psychiatry* **156**:1100–1102. doi:10.1176/ajp.156.7.1100
- Swanson LW. 1982. The Projections of the Ventral Tegmental Area and Adjacent Regions: A Combined Fluorescent Retrograde Tracer and Immunofluorescence Study in the Rat. *Brain Res Bull* **9**:321–353.
- Sweeten TL, Posey DJ, McDougle CJ. 2004. Brief Report: Autistic Disorder in Three Children with Cytomegalovirus Infection. *J Autism Dev Disord* **34**:583–586. doi:10.1007/s10803-004-2552-y
- Swinnen N, Smolders S, Avila A, Notelaers K, Paesen R, Ameloot M, Brône B, Legendre P, Rigo J-M. 2013. Complex invasion pattern of the cerebral cortex by microglial cells during development of the mouse embryo. *Glia* **61**:150–163. doi:10.1002/glia.22421
- Tan Y-L, Yuan Y, Tian L. 2020. Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Mol Psychiatry* **25**:351–367. doi:10.1038/s41380-019-0609-8
- Tanaka J, Maeda N. 1996. Microglial Ramification Requires Nondiffusible Factors Derived from Astrocytes. *Exp Neurol* **137**:367–375. doi:10.1006/exnr.1996.0038
- Tanaka J, Toku K, Sakanaka M, Maeda N. 1999. Morphological differentiation of microglial cells in culture: involvement of insoluble factors derived from astrocytes. *Neurosci Res* **34**:207–215. doi:10.1016/S0168-0102(99)00041-3
- Tang Y, Le W. 2016. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* **53**:1181–1194. doi:10.1007/s12035-014-9070-5
- Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. 2001. IRF Family of Transcription Factors as Regulators of Host Defense. *Annu Rev Immunol* **19**:623–655. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.623
- Tarabeux J, Kebir O, Gauthier J, Hamdan FF, Xiong L, Piton A, Spiegelman D, Henrion É, Millet B, Fathalli F, Joobor R, Rapoport JL, DeLisi LE, Fombonne É, Mottron L, Forget-Dubois N, Boivin M, Michaud JL, Drapeau P, Lafrenière RG, Rouleau GA, Krebs M-O. 2011. Rare mutations in N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in autism spectrum disorders and schizophrenia. *Transl Psychiatry* **1**:e55–e55. doi:10.1038/tp.2011.52
- Tarozzo G, Bortolazzi S, Crochemore C, Chen S-C, Lira A s., Abrams J s., Beltramo M. 2003. Fractalkine protein localization and gene expression in mouse brain. *J Neurosci Res* **73**:81–88. doi:10.1002/jnr.10645
- Tay TL, Mai D, Dautzenberg J, Fernández-Klett F, Lin G, Sagar, Datta M, Drougard A, Stempf T, Ardura-Fabregat A, Staszewski O, Margineanu A, Sporbert A, Steinmetz LM, Pospisilik JA, Jung S, Priller J, Grün D, Ronneberger O, Prinz M. 2017a. A new fate

mapping system reveals context-dependent random or clonal expansion of microglia. *Nat Neurosci* **20**:793–803. doi:10.1038/nn.4547

Tay TL, Savage JC, Hui CW, Bisht K, Tremblay M-È. 2017b. Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition: Microglia across the lifespan. *J Physiol* **595**:1929–1945. doi:10.1113/JP272134

Theile JW, Morikawa H, Gonzales RA, Morrisett RA. 2011. GABAergic transmission modulates ethanol excitation of ventral tegmental area dopamine neurons. *Neuroscience* **172**:94–103. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.10.046

Thompson IA, de Vries EFJ, Sommer IEC. 2020. Dopamine D2 up-regulation in psychosis patients after antipsychotic drug treatment **33**.

Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinänen R, Koistinaho J. 2001. Minocycline, a Tetracycline Derivative, Is Neuroprotective against Excitotoxicity by Inhibiting Activation and Proliferation of Microglia. *J Neurosci* **21**:2580–2588. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-08-02580.2001

Torrey EF, Bartko JJ, Lun Z-R, Yolken RH. 2007. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in Patients With Schizophrenia: A Meta-Analysis. *Schizophr Bull* **33**:729–736. doi:10.1093/schbul/sbl050

Traetta ME, Tremblay M-È. 2022. Prenatal inflammation shapes microglial immune response into adulthood. *Trends Immunol* **43**:953–955. doi:10.1016/j.it.2022.10.009

Tremblay M-È, Lowery RL, Majewska AK. 2010. Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience. *PLoS Biol* **8**:e1000527. doi:10.1371/journal.pbio.1000527

Tremblay M-È, Sierra A, editors. 2014. *Microglia in Health and Disease*, Springer. ed. Unpublished.

Tritsch NX, Ding JB, Sabatini BL. 2012. Dopaminergic neurons inhibit striatal output through non-canonical release of GABA. *Nature* **490**:262–266. doi:10.1038/nature11466

Trubetskoy V, Pardiñas AF, Qi T, Panagiotaropoulou G, Awasthi S, Bigdeli TB, Bryois J, Chen C-Y, Dennison CA, Hall LS, Lam M, Watanabe K, Frei O, Ge T, Harwood JC, Koopmans F, Magnusson S, Richards AL, Sidorenko J, Wu Y, Zeng J, Grove J, Kim M, Li Z, Voloudakis G, Zhang W, Adams M, Agartz I, Atkinson EG, Agerbo E, Al Eissa M, Albus M, Alexander M, Alizadeh BZ, Alptekin K, Als TD, Amin F, Arolt V, Arrojo M, Athanasiu L, Azevedo MH, Bacanu SA, Bass NJ, Begemann M, Belliveau RA, Bene J, Benyamin B, Bergen SE, Blasi G, Bobes J, Bonassi S, Braun A, Bressan RA, Bromet EJ, Bruggeman R, Buckley PF, Buckner RL, Bybjerg-Grauholm J, Cahn W, Cairns MJ, Calkins ME, Carr VJ, Castle D, Catts SV, Chambert KD, Chan RCK, Chaumette B, Cheng W, Cheung EFC, Chong SA, Cohen D, Consoli A, Cordeiro Q, Costas J, Curtis C, Davidson M, Davis KL, de Haan L, Degenhardt F, DeLisi LE, Demontis D, Dickerson F, Dikeos D, Dinan T, Djurovic S, Duan J, Ducci G, Dudbridge F, Eriksson JG, Fañanás L, Faraone SV, Fiorentino A, Forstner A, Frank J, Freimer NB, Fromer M, Frustaci A, Gadelha A, Genovese G, Gershon ES, Giannitelli M, Giegling I, Giusti-Rodríguez P, Godard S, Goldstein JI, González Peñas J, González-Pinto A,

Gopal S, Gratten J, Green MF, Greenwood TA, Guillin O, Gülöksüz S, Gur RE, Gur RC, Gutiérrez B, Hahn E, Hakonarson H, Haroutunian V, Hartmann AM, Harvey C, Hayward C, Henskens FA, Herms S, Hoffmann P, Howrigan DP, Ikeda M, Iyegbe C, Joa I, Julià A, Kähler AK, Kam-Thong T, Kamatani Y, Karachanak-Yankova S, Kebir O, Keller MC, Kelly BJ, Khrunin A, Kim S-W, Klovins J, Kondratiev N, Konte B, Kraft J, Kubo M, Kučinskis V, Kučinskiene ZA, Kusumawardhani A, Kuzelova-Ptackova H, Landi S, Lazzeroni LC, Lee PH, Legge SE, Lehrer DS, Lencer R, Lerer B, Li Miaoxin, Lieberman J, Light GA, Limborska S, Liu C-M, Lönnqvist J, Loughland CM, Lubinski J, Luykx JJ, Lynham A, Macek M, Mackinnon A, Magnusson PKE, Maher BS, Maier W, Malaspina D, Mallet J, Marder SR, Marsal S, Martin AR, Martorell L, Mattheisen M, McCarley RW, McDonald C, McGrath JJ, Medeiros H, Meier S, Melegh B, Melle I, Meshulam-Gately RI, Metspalu A, Michie PT, Milani L, Milanova V, Mitjans M, Molden E, Molina E, Molto MD, Mondelli V, Moreno C, Morley CP, Muntané G, Murphy KC, Myin-Germeys I, Nenadić I, Nestadt G, Nikitina-Zake L, Noto C, Nuechterlein KH, O'Brien NL, O'Neill FA, Oh S-Y, Olincy A, Ota VK, Pantelis C, Papadimitriou GN, Parellada M, Paunio T, Pellegrino R, Periyasamy S, Perkins DO, Pfuhlmann B, Pietiläinen O, Pimm J, Porteous D, Powell J, Quattrone D, Queded D, Radant AD, Rampino A, Rapaport MH, Rautanen A, Reichenberg A, Roe C, Roffman JL, Roth J, Rothermundt M, Rutten BPF, Saker-Delye S, Salomaa V, Sanjuan J, Santoro ML, Savitz A, Schall U, Scott RJ, Seidman LJ, Sharp SI, Shi J, Siever LJ, Sigurdsson E, Sim K, Skarabis N, Slominsky P, So H-C, Sobell JL, Söderman E, Stain HJ, Steen NE, Steixner-Kumar AA, Stögmänn E, Stone WS, Straub RE, Streit F, Strengman E, Stroup TS, Subramaniam M, Sugar CA, Suvisaari J, Svrakic DM, Swerdlow NR, Szatkiewicz JP, Ta TMT, Takahashi A, Terao C, Thibaut F, Toncheva D, Tooney PA, Torretta S, Tosato S, Tura GB, Turetsky BI, Üçok A, Vaaler A, van Amelsvoort T, van Winkel R, Veijola J, Waddington J, Walter H, Waterreus A, Webb BT, Weiser M, Williams NM, Witt SH, Wormley BK, Wu JQ, Xu Z, Yolken R, Zai CC, Zhou W, Zhu F, Zimprich F, Atbaşoğlu EC, Ayub M, Benner C, Bertolino A, Black DW, Bray NJ, Breen G, Buccola NG, Byerley WF, Chen WJ, Cloninger CR, Crespo-Facorro B, Donohoe G, Freedman R, Galletly C, Gandal MJ, Gennarelli M, Hougard DM, Hwu H-G, Jablensky AV, McCarroll SA, Moran JL, Mors O, Mortensen PB, Müller-Myhsok B, Neil AL, Nordentoft M, Pato MT, Petryshen TL, Pirinen M, Pulver AE, Schulze TG, Silverman JM, Smoller JW, Stahl EA, Tsuang DW, Vilella E, Wang S-H, Xu S, Indonesia Schizophrenia Consortium, Dai N, Wenwen Q, Wildenauer D. B., Agiananda F, Amir N, Antoni R, Arsianti T, Asmarahadi A, Diatri H, Djatmiko P, Irmansyah I, Khalimah S, Kusumadewi I, Kusumaningrum P, Lukman PR, Nasrun MW, Safyuni NS, Prasetyawan P, Semen G, Siste K, Tobing H, Widiastih N, Wiguna T, Wulandari D, Evalina N, Hananto AJ, Ismoyo JH, Marini TM, Henuhili S, Reza M, Yusnadewi S, PsychENCODE, Abyzov A, Akbarian S, Ashley-Koch A, van Bakel H, Breen M, Brown M, Bryois J, Carlyle B, Charney A, Coetzee G, Crawford G, Dracheva S, Emani P, Farnham P, Fromer M, Galeev T, Gandal M, Gerstein M, Giase G, Girdhar K, Goes F, Grennan K, Gu M, Guerra B, Gursoy G, Hoffman G, Hyde T, Jaffe A, Jiang S, Jiang Y, Kefi A, Kim Y, Kitchen R, Knowles JA, Lay F, Lee D, Li Mingfeng, Liu C, Liu S, Mattei E, Navarro F, Pan X, Peters MA, Pinto D, Pochareddy S, Polioudakis D, Purcaro M, Purcell S, Pratt H, Reddy T, Rhie S, Roussos Panagiotis, Rozowsky J, Sanders S, Sestan N, Sethi A, Shi X, Shieh A, Swarup V, Szekely A, Wang D, Warrell J, Weissman S, Weng Z, White K, Wiseman J, Witt H, Won H, Wood S, Wu F, Xu X, Yao L, Zandi P, Psychosis Endophenotypes International Consortium, Arranz MJ, Bakker S, Bender S, Bramon E, Collier DA, Crepo-Facorro B, Hall J, Iyegbe C, Kahn R, Lawrie S, Lewis C, Lin K, Linszen DH, Mata I, McIntosh A, Murray RM, Ophoff RA, van Os J, Powell

- J, Rujescu D, Walshe M, Weisbrod M, The SynGO Consortium, Achsel T, Andres-Alonso M, Bagni C, Bayés À, Biederer T, Brose N, Brown TC, Chua JJE, Coba MP, Cornelisse LN, de Jong APH, de Juan-Sanz J, Dieterich DC, Feng G, Goldschmidt HL, Gundelfinger ED, Hoogenraad C, Hugarir RL, Hyman SE, Imig C, Jahn R, Jung H, Kaeser PS, Kim E, Koopmans F, Kreutz MR, Lipstein N, MacGillavry HD, Malenka R, McPherson PS, O'Connor V, Pielot R, Ryan TA, Sahasrabudhe D, Sala C, Sheng M, Smalla K-H, Smit AB, Südhof TC, Thomas PD, Toonen RF, van Weering JRT, Verhage M, Verpelli C, Adolfsson R, Arango C, Baune BT, Belangero SI, Børglum AD, Braff D, Bramon E, Buxbaum JD, Campion D, Cervilla JA, Cichon S, Collier DA, Corvin A, Curtis D, Forti MD, Domenici E, Ehrenreich H, Escott-Price V, Esko T, Fanous AH, Gareeva A, Gawlik M, Gejman PV, Gill M, Glatt SJ, Golimbet V, Hong KS, Hultman CM, Hyman SE, Iwata N, Jönsson EG, Kahn RS, Kennedy JL, Khusnutdinova E, Kirov G, Knowles JA, Krebs M-O, Laurent-Levinson C, Lee J, Lencz T, Levinson DF, Li QS, Liu J, Malhotra AK, Malhotra D, McIntosh A, McQuillin A, Menezes PR, Morgan VA, Morris DW, Mowry BJ, Murray RM, Nimgaonkar V, Nöthen MM, Ophoff RA, Paciga SA, Palotie A, Pato CN, Qin S, Rietschel M, Riley BP, Rivera M, Rujescu D, Saka MC, Sanders AR, Schwab SG, Serretti A, Sham PC, Shi Y, St Clair D, Stefánsson H, Stefansson K, Tsuang MT, van Os J, Vawter MP, Weinberger DR, Werge T, Wildenauer Dieter B., Yu X, Yue W, Holmans PA, Pocklington AJ, Roussos Panos, Vassos E, Verhage M, Visscher PM, Yang J, Posthuma D, Andreassen OA, Kendler KS, Owen MJ, Wray NR, Daly MJ, Huang H, Neale BM, Sullivan PF, Ripke S, Walters JTR, O'Donovan MC, Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, de Haan L, van Amelsvoort T, van Winkel R, Gareeva A, Sham PC, Shi Y, St Clair D, van Os J. 2022. Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia. *Nature* **604**:502–508. doi:10.1038/s41586-022-04434-5
- Trutti AC, Mulder MJ, Hommel B, Forstmann BU. 2019. Functional neuroanatomical review of the ventral tegmental area. *NeuroImage* **191**:258–268. doi:10.1016/j.neuroimage.2019.01.062
- Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA. 2001. Control of synapse number by glia. *Science* **291**:657–661. doi:10.1126/science.291.5504.657
- Urbano M, Okwara L, Manser P, Hartmann K, Deutsch SI. 2015. A Trial of D-Cycloserine to Treat the Social Deficit in Older Adolescents and Young Adults With Autism Spectrum Disorders. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **27**:133–138. doi:10.1176/appi.neuropsych.13070155
- Urbano M, Okwara L, Manser P, Hartmann K, Herndon A, Deutsch SI. 2014. A Trial of D-Cycloserine to Treat Stereotypies in Older Adolescents and Young Adults With Autism Spectrum Disorder. *Clin Neuropharmacol* **37**:69–72. doi:10.1097/WNF.0000000000000033
- van Wageningen TA, Vlaar E, Kooij G, Jongenelen CAM, Geurts JJG, van Dam A-M. 2019. Regulation of microglial TMEM119 and P2RY12 immunoreactivity in multiple sclerosis white and grey matter lesions is dependent on their inflammatory environment. *Acta Neuropathol Commun* **7**:206. doi:10.1186/s40478-019-0850-z
- Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. 2005. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol* **57**:67–81. doi:10.1002/ana.20315

- Verney C, Monier A, Fallet-Bianco C, Gressens P. 2010. Early microglial colonization of the human forebrain and possible involvement in periventricular white-matter injury of preterm infants. *J Anat* **217**:436–448. doi:10.1111/j.1469-7580.2010.01245.x
- Verney C, Zecevic N, Puelles L. 2001. Structure of longitudinal brain zones that provide the origin for the substantia nigra and ventral tegmental area in human embryos, as revealed by cytoarchitecture and tyrosine hydroxylase, calretinin, calbindin, and GABA immunoreactions. *J Comp Neurol* **429**:22–44. doi:10.1002/1096-9861(2000101)429:1<22::AID-CNE3>3.0.CO;2-X
- Vidal PM, Pacheco R. 2020. The Cross-Talk Between the Dopaminergic and the Immune System Involved in Schizophrenia. *Front Pharmacol* **11**:394. doi:10.3389/fphar.2020.00394
- Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. 2009. Resting Microglia Directly Monitor the Functional State of Synapses In Vivo and Determine the Fate of Ischemic Terminals. *J Neurosci* **29**:3974–3980. doi:10.1523/JNEUROSCI.4363-08.2009
- Walker DG. 2020. Defining activation states of microglia in human brain tissue: an unresolved issue for Alzheimer’s disease. *Neuroimmunol Neuroinflammation* **2020**. doi:10.20517/2347-8659.2020.09
- Walker DG, Lue L-F. 2015. Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimers Res Ther* **7**:56. doi:10.1186/s13195-015-0139-9
- Walls JR, Coultas L, Rossant J, Henkelman RM. 2008. Three-Dimensional Analysis of Vascular Development in the Mouse Embryo. *PLoS ONE* **3**:e2853. doi:10.1371/journal.pone.0002853
- Wang M, Ling K-H, Tan J, Lu C-B. 2020. Development and Differentiation of Midbrain Dopaminergic Neuron: From Bench to Bedside. *Cells* **9**:1489. doi:10.3390/cells9061489
- Wang Y, Szretter KJ, Vermi W, Gilfillan S, Rossini C, Cella M, Barrow AD, Diamond MS, Colonna M. 2012. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat Immunol* **13**:753–760. doi:10.1038/ni.2360
- Watabe-Uchida M, Zhu L, Ogawa SK, Vamanrao A, Uchida N. 2012. Whole-Brain Mapping of Direct Inputs to Midbrain Dopamine Neurons. *Neuron* **74**:858–873. doi:10.1016/j.neuron.2012.03.017
- Watson CG, Kucala T, Tilleskjoer C, Jacobs L. 1984. Schizophrenic Birth Seasonality in Relation to the Incidence of Infectious Diseases and Temperature Extremes. *Arch Gen Psychiatry* **41**:85–90. doi:10.1001/archpsyc.1984.01790120089011
- We J, Kozielski R, Trenkner E, Wiktor-Je W. 1998. Reduced number and altered morphology of microglial cells in colony stimulating factor-1-deficient osteopetrotic op r op mice.

- Wei S, Nandi S, Chitu V, Yeung Y-G, Yu W, Huang M, Williams LT, Lin H, Stanley ER. 2010. Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *J Leukoc Biol* **88**:495–505. doi:10.1189/jlb.1209822
- Weinhard L, di Bartolomei G, Bolasco G, Machado P, Schieber NL, Neniskyte U, Exiga M, Vadisiute A, Raggioli A, Schertel A, Schwab Y, Gross CT. 2018. Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nat Commun* **9**:1228. doi:10.1038/s41467-018-03566-5
- West PK, McCorkindale AN, Guenewig B, Ashhurst TM, Viengkhou B, Hayashida E, Jung SR, Butovsky O, Campbell IL, Hofer MJ. 2022. The cytokines interleukin-6 and interferon- α induce distinct microglia phenotypes. *J Neuroinflammation* **19**:96. doi:10.1186/s12974-022-02441-x
- Westerink BH, Kwint HF, deVries JB. 1996. The pharmacology of mesolimbic dopamine neurons: a dual-probe microdialysis study in the ventral tegmental area and nucleus accumbens of the rat brain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **16**:2605–2611. doi:10.1523/JNEUROSCI.16-08-02605.1996
- Williams GV, Goldman-Rakic PS. 1995. Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature* **376**.
- Wink LK, Minshawi NF, Shaffer RC, Plawecki MH, Posey DJ, Horn PS, Adams R, Pedapati EV, Schaefer TL, McDougle CJ, Swiezy NB, Erickson CA. 2017. d-Cycloserine enhances durability of social skills training in autism spectrum disorder. *Mol Autism* **8**:2. doi:10.1186/s13229-017-0116-1
- Wojcik SM, Katsurabayashi S, Guillemain I, Friauf E, Rosenmund C, Brose N, Rhee J-S. 2006. A Shared Vesicular Carrier Allows Synaptic Corelease of GABA and Glycine. *Neuron* **50**:575–587. doi:10.1016/j.neuron.2006.04.016
- Wong K. 2001. The search for autism's roots. *Nature* **411**:882–884. doi:10.1038/35082228
- Woodruff GN, McCarthy PS, Walker RJ. 1976. Studies on the pharmacology of neurones in the nucleus accumbens of the rat. *Brain Res* **115**:233–242. doi:10.1016/0006-8993(76)90509-6
- Wright-Jin EC, Gutmann DH. 2019. Microglia as Dynamic Cellular Mediators of Brain Function. *Trends Mol Med* **25**:967–979. doi:10.1016/j.molmed.2019.08.013
- Wu J, Kung J, Dong J, Chang L, Xie C, Habib A, Hawes S, Yang N, Chen V, Liu Z, Evans R, Liang B, Sun L, Ding J, Yu J, Saez-Atienzar S, Tang B, Khaliq Z, Lin D-T, Le W, Cai H. 2019. Distinct Connectivity and Functionality of Aldehyde Dehydrogenase 1a1-Positive Nigrostriatal Dopaminergic Neurons in Motor Learning. *Cell Rep* **28**:1167-1181.e7. doi:10.1016/j.celrep.2019.06.095
- Xia Y, Driscoll JR, Wilbrecht L, Margolis EB, Fields HL, Hjelmstad GO. 2011. Nucleus Accumbens Medium Spiny Neurons Target Non-Dopaminergic Neurons in the Ventral Tegmental Area. *J Neurosci* **31**:7811–7816. doi:10.1523/JNEUROSCI.1504-11.2011

- Xiao J, Buka SL, Cannon TD, Suzuki Y, Viscidi RP, Torrey EF, Yolken RH. 2009. Serological pattern consistent with infection with type I *Toxoplasma gondii* in mothers and risk of psychosis among adult offspring. *Microbes Infect* **11**:1011–1018. doi:10.1016/j.micinf.2009.07.007
- Yamaguchi T, Qi J, Wang H-L, Zhang S, Morales M. 2015. Glutamatergic and dopaminergic neurons in the mouse ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* **41**:760–772. doi:10.1111/ejn.12818
- Yamaguchi T, Sheen W, Morales M. 2007. Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area: Glutamatergic neurons in the VTA. *Eur J Neurosci* **25**:106–118. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05263.x
- Yamaguchi T, Wang H-L, Li X, Ng TH, Morales M. 2011. Mesocorticolimbic Glutamatergic Pathway. *J Neurosci* **31**:8476–8490. doi:10.1523/JNEUROSCI.1598-11.2011
- Yan Y, Jiang W, Liu L, Wang X, Ding C, Tian Z, Zhou R. 2015. Dopamine Controls Systemic Inflammation through Inhibition of NLRP3 Inflammasome. *Cell* **160**:62–73. doi:10.1016/j.cell.2014.11.047
- Yang Yirong, Salayandia VM, Thompson JF, Yang LY, Estrada EY, Yang Yi. 2015. Attenuation of acute stroke injury in rat brain by minocycline promotes blood–brain barrier remodeling and alternative microglia/macrophage activation during recovery. *J Neuroinflammation* **12**:26. doi:10.1186/s12974-015-0245-4
- Ybot-Gonzalez P, Gaston-Massuet C, Girdler G, Klingensmith J, Arkell R, Greene NDE, Copp AJ. 2007. Neural plate morphogenesis during mouse neurulation is regulated by antagonism of Bmp signalling. *Development* **134**:3203–3211. doi:10.1242/dev.008177
- Ye W, Shimamura K, Rubenstein JLR, Hynes MA, Rosenthal A. 1998. FGF and Shh Signals Control Dopaminergic and Serotonergic Cell Fate in the Anterior Neural Plate. *Cell* **93**:755–766. doi:10.1016/S0092-8674(00)81437-3
- Yeh L-F, Watanabe M, Sulkes-Cuevas J, Johansen JP. 2018. Dysregulation of aversive signaling pathways: a novel circuit endophenotype for pain and anxiety disorders. *Curr Opin Neurobiol* **48**:37–44. doi:10.1016/j.conb.2017.09.006
- Yip J, Soghomonian JJ, Blatt GJ. 2009. Decreased GAD65 mRNA levels in select subpopulations of neurons in the cerebellar dentate nuclei in autism: an in situ hybridization study. *Autism Res* **2**:50–59. doi:10.1002/aur.62
- Yong VW, Wells J, Giuliani F, Casha S, Power C, Metz LM. 2004. The promise of minocycline in neurology. *Lancet Neurol* **3**:744–751. doi:10.1016/S1474-4422(04)00937-8
- Yrjänheikki J, Tikka T, Keinänen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J. 1999. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:13496–13500. doi:10.1073/pnas.96.23.13496

- Zaretsky MV, Alexander JM, Byrd W, Bawdon RE. 2004. Transfer of Inflammatory Cytokines Across the Placenta: *Obstet Gynecol* **103**:546–550. doi:10.1097/01.AOG.0000114980.40445.83
- Zhang L. 2004. D1 Dopamine Receptor Regulation of the Levels of the Cell-cycle-controlling Proteins, Cyclin D, P27 and Raf-1, in Cerebral Cortical Precursor Cells is Mediated Through cAMP-independent Pathways. *Cereb Cortex* **15**:74–84. doi:10.1093/cercor/bhh110
- Zhang L, Zhang J, You Z. 2018. Switching of the Microglial Activation Phenotype Is a Possible Treatment for Depression Disorder. *Front Cell Neurosci* **12**:306. doi:10.3389/fncel.2018.00306
- Zhang S, Qi J, Li X, Wang H-L, Britt JP, Hoffman AF, Bonci A, Lupica CR, Morales M. 2015. Dopaminergic and glutamatergic microdomains in a subset of rodent mesoaccumbens axons. *Nat Neurosci* **18**:386–392. doi:10.1038/nn.3945
- Zhang X, Shi W. 1999. Dendritic glutamate-induced bursting in prefrontal pyramidal cells: role of NMDA and non-NMDA receptors. *Acta Pharmacol Sin* **20**:1125131–1121131.
- Zheng Z, Zhu T, Qu Y, Mu D. 2016. Blood Glutamate Levels in Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE* **11**:e0158688. doi:10.1371/journal.pone.0158688
- Zhou H, Martinez E, Lin HH, Yang R, Dale JA, Liu K, Huang D, Wang J. 2018. Inhibition of the Prefrontal Projection to the Nucleus Accumbens Enhances Pain Sensitivity and Affect. *Front Cell Neurosci* **12**:240. doi:10.3389/fncel.2018.00240
- Zhu F, Zheng Y, Liu Y, Zhang X, Zhao J. 2014. Minocycline alleviates behavioral deficits and inhibits microglial activation in the offspring of pregnant mice after administration of polyriboinosinic-polyribocytidilic acid. *Psychiatry Res* **219**:680–686. doi:10.1016/j.psychres.2014.06.046
- Ziebell JM, Taylor SE, Cao T, Harrison JL, Lifshitz J. 2012. Rod microglia: elongation, alignment, and coupling to form trains across the somatosensory cortex after experimental diffuse brain injury. *J Neuroinflammation* **9**:247. doi:10.1186/1742-2094-9-247
- Zujovic V, Schussler N, Jourdain D, Duverger D, Taupin V. 2001. In vivo neutralization of endogenous brain fractalkine increases hippocampal TNF α and 8-isoprostane production induced by intracerebroventricular injection of LPS.
- Zusso M, Methot L, Lo R, Greenhalgh AD, David S, Stifani S. 2012. Regulation of Postnatal Forebrain Amoeboid Microglial Cell Proliferation and Development by the Transcription Factor Runx1. *J Neurosci* **32**:11285–11298. doi:10.1523/JNEUROSCI.6182-11.2012

Annexes

Article A. La sur-expression de la protéine du complément C4 dans le cortex préfrontal chez la souris induit des endophénotypes associés à la schizophrénie



Elevated expression of complement C4 in the mouse prefrontal cortex causes schizophrenia-associated phenotypes

Mélanie Druart^{1,2,3} · Marika Nosten-Bertrand^{1,2,3} · Stefanie Poll⁴ · Sophie Crux⁴ · Felix Nebeling⁴ · Célia Delhaye^{1,2,3} · Yaëlle Dubois^{1,2,3} · Manuel Mittag⁴ · Marion Leboyer^{5,6} · Ryad Tamouza^{5,6} · Martin Fuhrmann⁴ · Corentin Le Magueresse^{1,2,3}

Received: 4 July 2020 / Revised: 5 March 2021 / Accepted: 26 March 2021 / Published online: 9 April 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2021

Abstract

Accumulating evidence supports immune involvement in the pathogenesis of schizophrenia, a severe psychiatric disorder. In particular, high expression variants of *C4*, a gene of the innate immune complement system, were shown to confer susceptibility to schizophrenia. However, how elevated *C4* expression may impact brain circuits remains largely unknown. We used in utero electroporation to overexpress *C4* in the mouse prefrontal cortex. We found reduced glutamatergic input to pyramidal cells of juvenile and adult, but not of newborn *C4*-overexpressing (*C4*-OE) mice, together with decreased spine density, which mirrors spine loss observed in the schizophrenic cortex. Using time-lapse two-photon imaging in vivo, we observed that these deficits were associated with decreased dendritic spine gain and elimination in juvenile *C4*-OE mice, which may reflect poor formation and/or stabilization of immature spines. In juvenile and adult *C4*-OE mice, we found evidence for NMDA receptor hypofunction, another schizophrenia-associated phenotype, and synaptic accumulation of calcium-permeable AMPA receptors. Alterations in cortical GABAergic networks have been repeatedly associated with schizophrenia. We found that functional GABAergic transmission was reduced in *C4*-OE mice, in line with diminished GABA release probability from parvalbumin interneurons, lower GAD67 expression, and decreased intrinsic excitability in parvalbumin interneurons. These cellular abnormalities were associated with working memory impairment. Our results substantiate the causal relationship between an immunogenetic risk factor and several distinct cortical endophenotypes of schizophrenia and shed light on the underlying cellular mechanisms.

These authors contributed equally: Marika Nosten-Bertrand, Stefanie Poll, Sophie Crux, Felix Nebeling

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01081-6>.

✉ Corentin Le Magueresse
corentin.le-magueresse@inserm.fr

- ¹ INSERM UMR-S 1270, Paris, France
- ² Sorbonne Université, Paris, France
- ³ Institut du Fer à Moulin, Paris, France
- ⁴ Neuroimmunology and Imaging Group, German Center for Neurodegenerative Diseases, Bonn, Germany
- ⁵ INSERM U955, Neuro-Psychiatrie Translationnelle, Université Paris-Est, Créteil, France
- ⁶ AP-HP, DMU IMPACT, Département Médical Universitaire de Psychiatrie, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Créteil, France

Introduction

Genome-wide association studies (GWAS) identified genes involved in immune and in autoimmune processes that are associated with schizophrenia (SZ) [1–4]. The major GWAS locus in SZ lies within the major histocompatibility complex (MHC) locus on chromosome 6 [4]. This includes the *C4* gene which consists of *C4A* and *C4B* gene copy number variations and insertion/deletion of the human endogenous retrovirus K (HERVK). A detailed analysis of this locus showed a strong relationship between the genetic diversity of the *C4* region and SZ [5]. In particular, the presence of several copies of *C4A* with HERVK insertions correlated with higher *C4A* expression and increased risk of SZ. The complement pathway is a central determinant of synaptic pruning, a developmental process in which the synaptic connections between neurons are refined in the brain from childhood until early adulthood [6]. Thus, the identification of *C4A* as a risk factor in SZ established a link

between complement-mediated synaptic pruning and dendritic spine loss in the cortex of schizophrenic patients, a characteristic feature of the disease which had long been hypothesized to reflect excessive synapse refinement in adolescence [7, 8].

In mice, the *C4b* gene presents homology with both the *C4A* and *C4B* genetic motifs of the human *C4* gene locus. Connectivity between the retina and the visual thalamus is impaired in *C4* knock-out mice [5], indicating that the mouse *C4* protein participates in synaptic pruning. It has been hypothesized that high *C4* expression may result in increased synaptic pruning in upper layers of the neocortex [5]. Indeed, *C4A* and *C4B* gene copy numbers positively correlated with neuropil contraction, which is often considered as a mesoscale correlate of developmental synapse elimination [9]. *C4A* gene copy numbers are associated with increased neuronal complement deposition and microglial synapse uptake in cocultures of human iPSC-derived neurons and microglial cells [10]. Furthermore, it was shown that elevated *C4* expression in the mouse prefrontal cortex (PFC) causes dendritic spine loss, increased engulfment of synaptic material by microglial cells, and impaired social behaviors [11]. A recently published study also showed that mice overexpressing human *C4A* display reduced cortical synapse density, increased microglial engulfment of synapses, and altered social behavior, anxiety levels, and spatial short-term memory [12].

In addition to spine loss, several neural endophenotypes have been identified in the cortex of schizophrenic patients. Decreased NMDA receptor (NMDAR)-mediated neurotransmission in SZ has been inferred from at least four lines of evidence [13]: (1) NMDAR antagonists induce schizophrenic-like behaviors; (2) the expression of NMDAR subunits is reduced in postmortem brain tissue from schizophrenic patients; (3) autoantibodies against NMDARs cause clinical symptoms of SZ; and (4) *GRIN2A*, an NMDAR subunit-encoding gene, has been associated with SZ in recent GWAS. Moreover, multiple deficits in GABAergic circuits have been identified in SZ. Abnormalities in GABAergic networks include reduced GABA concentration in the brain of schizophrenic patients, decreased expression of *GAD67*, an enzyme responsible for GABA synthesis, and abnormalities at parvalbumin (PV)-expressing neuron-pyramidal cell synapses [14]. What causes these distinct alterations and how they relate to each other is poorly understood. The relationship between *C4* and SZ-associated cortical endophenotypes such as reduced NMDAR-mediated transmission, loss of *GAD67* expression, and altered GABAergic synapses remains unknown.

Here, we examined the consequences of complement *C4* overexpression in layer II/III pyramidal cells of the mouse PFC on neuronal circuit development and function. *C4* overexpression recapitulated several cortical phenotypes

that have been associated with SZ, including decreased spine number and reduced NMDAR function in pyramidal cells. Intriguingly, dendritic spine loss was accompanied by decreased spine turnover in juvenile mice. We also report several abnormalities in GABAergic circuits in *C4*-overexpressing (*C4*-OE) mice which are consistent with the alterations of GABAergic markers seen in the brain of SZ patients. Finally, our results reveal that the selective overexpression of *C4* in PFC layer II/III is sufficient to impair working memory, which is reminiscent of SZ-associated cognitive deficits.

Methods

A brief summary of experimental procedures is provided here with additional details available in Supplementary Information accompanying this article. In addition, Supplementary Tables S1–4 provide an overview of the number of recordings, animals, and statistics in the different experiments.

Animals

All animal experiments were performed according to guidelines of the European Community for the use of animals in research and were approved by the local ethical committees (C2EA-05 in France; LANUV NRW in Germany). All experiments were performed on mice that had been electroporated at embryonic stage E15 and were on a C57Bl/6J background.

In utero electroporation

Pregnant mice at E15 were anesthetized by isoflurane 4% and were injected with flunixin (0.05 mg/kg body weight) before surgery. The surgery was performed under isoflurane 2% on a heated blanket and breathing was carefully monitored during all the procedure.

0.5 μ l to 1 μ l of a DNA solution containing pCAG-C4HA and pCAG-tdTomato at a molar ratio of 4:1 (final DNA concentration of 0.8 μ g/ μ l) was pressure injected into the lateral ventricle of each embryo. In the control condition, a solution containing pCAG-TdTomato (0.8 μ g/ μ l) alone was injected. Electrical pulses (50 V; 50 ms) were applied five times at intervals of 950 ms with an electroporator (see Supplementary Information).

In vivo two-photon imaging

Two-photon imaging was performed right after surgery at a Zeiss 7 multiphoton microscope with a Zeiss \times 20 objective (NA = 1). TdTomato fluorescence was excited at 980 nm using an InSight X3 tunable laser (Spectra-Physics) and

collected through a 617/73 band-pass filter on a highly sensitive nondescanned detector. After the first imaging session, the mice woke up and were placed in a cage with their littermates for 4–5 h (P15–18). For the second imaging session, the mice were again anesthetized with isoflurane (initially 3%, then 1–1.5% for anesthesia maintenance) and imaged to retrieve the same dendritic structures recorded in the first imaging session (see Supplementary Information).

Histology

Mice aged P30 were anesthetized with pentobarbital (150 mg/kg) and intracardially perfused with PBS followed by 4% buffered formaldehyde (Histofix, Roti). Free-floating sections were processed for immunohistochemistry as described in Supplementary Information. Images were acquired using a confocal microscope (SP5, Leica) and analyzed according to procedures described in Supplementary Information.

Acute slice preparation, ex vivo electrophysiology, and optogenetics

Two hundred and fifty micrometers thick slices were prepared from brains of control and C4-OE mice. For patch-clamp recordings, slices were transferred to the recording chamber where they were continuously superfused with ACSF (30–32 °C) buffered by continuous bubbling with 95% O₂–5% CO₂.

Whole-cell current and voltage-clamp recordings were performed in PFC layer II/III. Stimulus delivery and data acquisition were performed using Patchmaster software (Multichannel Systems). Signals were acquired with an EPC10-usb amplifier (Multichannel Systems), sampled at 20 kHz, and filtered at 4 kHz. For optogenetic experiments, pulses of blue light (wavelength 470 nm) were emitted by a light emitting diode (CoolLED). Offline analysis was performed using Clampfit (Molecular Devices) and Igor Pro (Wavemetrics). For the study of miniature postsynaptic currents, recordings were filtered offline at 2 kHz and analyzed using MiniAnalysis (Synaptosoft), see Supplementary Information.

Behavior

Tests for locomotor activity (actimeter, open field) and working memory (learning of a nonmatching to sample task, odor span test, spatial span test) were performed and analyzed as described in Supplementary Information.

Statistical analysis

Data are presented as mean ± SEM. Statistical analyses were performed using Prism (GraphPad). The normality of data

distribution was tested using Shapiro–Wilk’s test. Unpaired two-tailed *T*-tests (for normally distributed datasets) or Mann–Whitney tests (for nonnormally distributed datasets) were used for comparisons between two groups. For multiple comparisons, we used two-way ANOVA followed by Sidak’s test. Values of *P* < 0.05 were considered statistically significant. *P* values are reported as follows: **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001; *****P* < 0.0001.

Results

Generation of C4-OE mice using in utero electroporation

Using in utero electroporation in C57Bl/6J mice, we selectively overexpressed the C4-encoding C4b gene, the mouse homolog of the human C4A and C4B genes, in layer II/III pyramidal cells of the PFC. Targeted PFC areas included the cingulate, prelimbic, and infralimbic cortices (Supplementary Fig. S1A). To identify C4-OE neurons using immunohistochemistry, an HA tag was added at the N-terminal end of the C4b overexpression construct before the signal peptide. In addition, we coelectroporated the C4b construct with a tdTomato-expressing construct, in order to enable the identification of C4-expressing, tdTomato-positive (tdTom+) neurons in acute brain slices (Supplementary Fig. S1B, C). To ensure that most tdTom+ neurons indeed overexpress C4, we coelectroporated the C4b construct and the tdTomato construct with a 4:1 ratio. Immunohistochemistry for HA and tdTomato confirmed that 98.7 ± 1.8% of tdTom+ neurons also expressed C4 (Supplementary Fig. S1D, E). Control mice were electroporated with the tdTomato construct only. Due to the selectivity of the in utero electroporation procedure, which exclusively targets dividing progenitors of the ventricular zone, C4 overexpression was restricted to pyramidal cells. Interneurons or glial cells did not express the electroporated plasmids. Accordingly, all tdTomato-expressing cells had the characteristic morphology of cortical pyramidal cells, including a prominent apical dendrite projecting toward the pial surface.

In immunoblots on lysates from the electroporated area, the HA tag was only detected at the molecular weight of the full-length form of C4 before its proteolytic cleavage (prepro-C4, ~200 kDa) in the C4-OE condition, suggesting that the HA tag was correctly cleaved together with the signal peptide (Supplementary Fig. S1F, G). To quantify C4 overexpression in the electroporated area using western blot, we first evaluated several anti-C4 antibodies and found that an anti-C4 antibody raised against a motif of the α-chain of human C4 reliably detected a band of the expected molecular weight in cortical tissue from control and C4-OE mice (Supplementary Fig. S1G). Using this antibody, we found that C4 protein

expression was increased ~1.38-fold in P30 mice in the C4-OE condition (Supplementary Fig. S1H). We observed no neuronal mispositioning in C4-OE mice, suggesting the absence of major migration defects (Supplementary Fig. S2).

Loss of excitatory synapses in C4-OE neurons from juvenile and adult, but not neonatal mice

We first evaluated passive and active cellular properties in tdTom+ layer II/III pyramidal cells using whole-cell patch-clamp *ex vivo*. The firing properties, membrane resistance,

cell capacitance, and resting membrane potential were similar in control and C4-OE neurons (Supplementary Fig. S3; Supplementary Table S1). We next examined excitatory synaptic transmission at three developmental stages. The frequency of miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) in control tdTom+ cells markedly increased from early postnatal development (age P9 and P10) to the juvenile stage (P25–P30), consistent with increased synapse generation, before decreasing from the juvenile stage to adulthood (P150–P220), in line with synapse elimination in the maturing cortex (Fig. 1A, B;

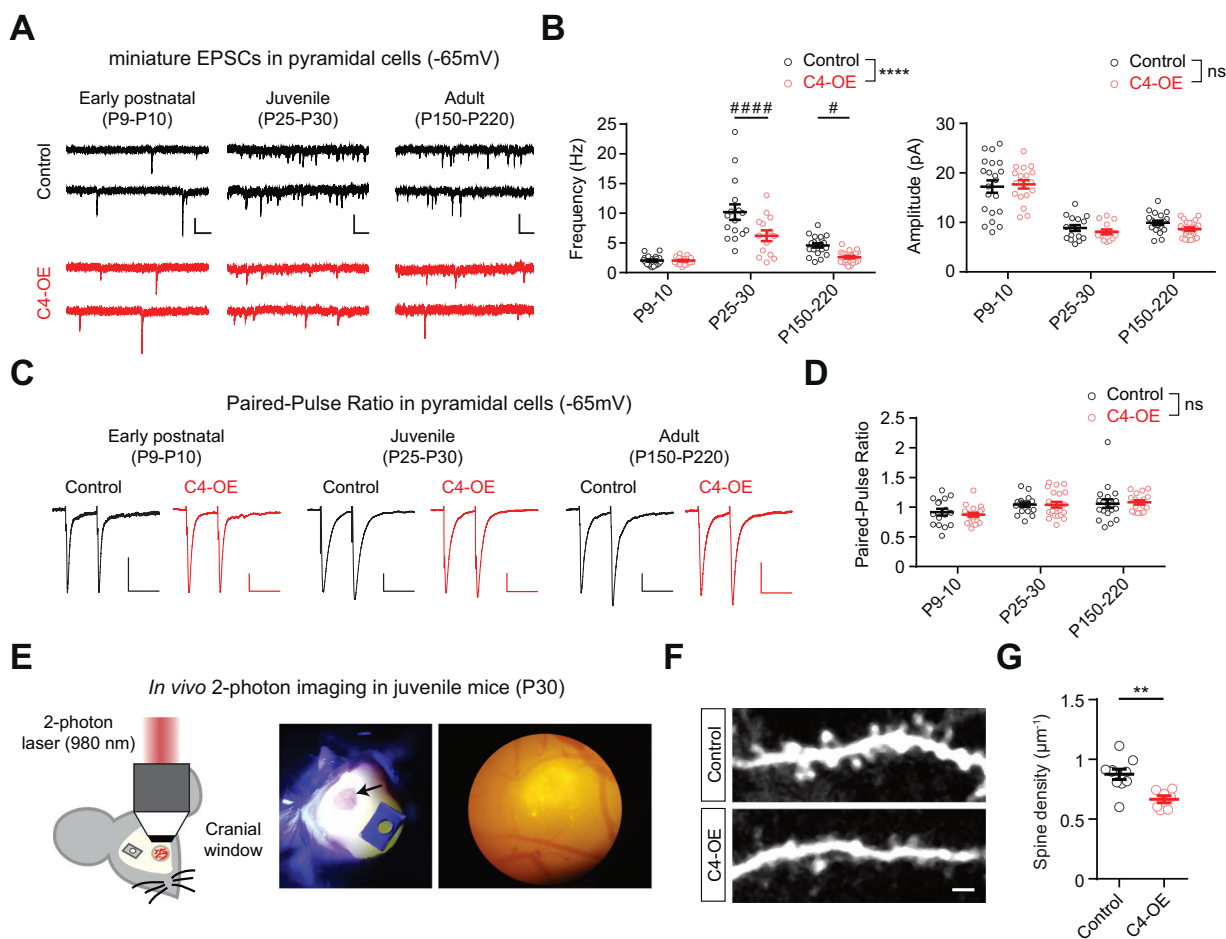


Fig. 1 Reduced excitatory input onto C4-OE pyramidal cells.

A Sample traces of mEPSCs in control and C4-OE pyramidal cells at three developmental stages; scale bars: 20 pA/100 ms. **B** mEPSC frequency was affected by C4-OE in juvenile and adult mice, but not in pups (two-way ANOVA, main effect, $****P < 0.0001$; Sidak's post hoc test, $####P < 0.0001$, $#P < 0.05$, n.s. not significant). mEPSC amplitude was not significantly affected (control: early postnatal, $n = 21$ cells from three mice; juvenile, $n = 16$ cells from five mice; adult, $n = 20$ cells from four mice; C4-OE: early postnatal, $n = 21$ cells from three mice; juvenile, $n = 16$ cells from five mice; adult, $n = 20$ cells from four mice). **C** Average traces of eEPSCs evoked by paired-pulse stimulation with 50 ms interpulse interval, recorded from control and C4-OE pyramidal cells at three developmental stages; scale bars: 50 pA/50 ms. **D** Similar paired-pulse ratio in control and C4-OE

pyramidal cells (n.s., not significant. control: early postnatal, $n = 16$ cells from three mice; juvenile, $n = 17$ cells from three mice; adult, $n = 19$ cells from five mice; C4-OE: early postnatal, $n = 21$ cells from three mice; juvenile, $n = 21$ cells from three mice; adult, $n = 17$ cells from four mice). All data are represented as mean \pm SEM. Each open circle represents an individual cell. **E** Left, schematic drawing illustrating two-photon *in vivo* imaging in PFC at P30. Right, cranial window. **F** Examples of apical dendrites from electroporated pyramidal cells in control and C4-OE mice aged P30. **G** C4-OE decreased dendritic spine density in electroporated pyramidal cells from P30 mice; scale bar: 2 μ m. (*T*-test, $**P < 0.023$; control: $n = 10$ mice; C4-OE: $n = 7$ mice). All data are represented as mean \pm SEM. Each open circle represents an individual mouse.

Supplementary Table S1). The paired-pulse ratio of evoked EPSCs, a measure which is sensitive to alterations in pre-synaptic release probability, did not change significantly in control tdTom+ cells throughout development (Fig. 1C, D; Supplementary Table S1). Interestingly, mEPSC frequency was similar in control and C4-OE mice at P9 and dP10, but was significantly lower in C4-OE mice in juvenile and adult mice (Fig. 1B; two-way ANOVA, $P < 0.0001$; juvenile: Sidak's post hoc test, $P < 0.0001$; adulthood: Sidak's post hoc test, $P < 0.05$; Supplementary Table S1). The paired-pulse ratio of evoked EPSCs did not differ between C4-OE and control mice in any age group (Fig. 1D). We also observed a decrease in mEPSC amplitude from early development to the juvenile stage, but this was comparable in control and C4-OE mice (Fig. 1B; Supplementary Table S1).

C4 overexpression results in diminished formation and elimination of spines in juvenile PFC

To establish whether decreased functional excitatory input in C4-OE pyramidal cells correlates with reduced spine density, we imaged dendritic spines of tdTom+ pyramidal cells in layer I/II of the PFC using in vivo two-photon imaging in juvenile (P30) mice (Fig. 1E). We found a substantial spine density decrease in C4-OE neurons (Fig. 1F, G; T -test, $P = 0.0023$; Supplementary Table S2). These results suggested that the reduction in spine density in C4-OE neurons is due to imbalanced spine dynamics (gain and loss) occurring prior to P30. Therefore, we performed dynamic imaging studies in mice aged P15–P18, which corresponds to a period of heightened structural synaptic plasticity [15–17]. Here, we imaged dendrites twice at a 4-h interval (Fig. 2A) to study fast spine kinetics at this stage of active synaptic reorganization. Similar to the P30 cohort, C4-OE neurons in P15–P18 mice displayed a robust decrease in spine density (Fig. 2B, C; Mann–Whitney test, $P < 0.0001$; Supplementary Table S2). While the overall spine density within the experimental groups did not change over the course of 4 h (Fig. 2D, E; Table S2), C4 overexpression had a strong effect on the structural plasticity of single spines; first, C4-OE neurons formed fewer stable spines (Fig. 2F; T -test, $P = 0.0007$; Supplementary Table S2). Second, C4-OE neurons showed decreased numbers of both gained and lost spines (Fig. 2G, H; gained: T -test, $P = 0.0018$; lost: T -test, $P < 0.0001$; also see Fig. 2F; Supplementary Table S2) resulting in an overall significantly reduced turnover of dendritic spines (Fig. 2I; T -test, $P = 0.0039$; Supplementary Table S2). In summary, we show here that C4 overexpression results in diminished formation/stabilization and elimination of spines in juvenile PFC in vivo. To study dendritic spines with improved spatial resolution, we imaged fixed postmortem samples

from P15–P18 control and C4-OE mice using confocal microscopy with an Airyscan detector, and obtained morphological reconstructions of dendritic spines using the Imaris software. These data confirmed the significant decrease in spine density in C4-OE neurons (Supplementary Fig. S4A, B; T -test, $P = 0.023$). We plotted key morphological parameters (dendritic spine length, maximum head diameter, ratio of mean head to neck diameters) in three dimensions. The 3D plot revealed differences in the distributions of the morphological parameters (Supplementary Fig. S4C). A cluster analysis [18] (“agglomerative hierarchical clustering” analysis based on Euclidian distance in the parameter space, see Supplementary Materials and Methods) revealed at least three distinct populations of spines, which resemble the different categories commonly used in the literature to classify dendritic spines (“small” \cong cluster 1, “thin” \cong cluster 2, and “mushroom-like” \cong cluster 3; Supplementary Fig. S4D–F). The distribution of spines in the three clusters was similar in the control and C4-OE conditions (Supplementary Fig. S4E, F).

NMDAR hypofunction in C4-OE pyramidal cells

To investigate NMDAR-mediated transmission in the cortex of C4-OE mice, we measured the AMPA/NMDA ratio of evoked EPSCs in tdTom+ cells. The AMPA/NMDA ratio was comparable in control and C4-OE neonates, but was significantly increased in juvenile and adult C4-OE mice (Fig. 3A, B; two-way ANOVA, $P < 0.0001$; juvenile and adult mice: Sidak's test, $P < 0.001$; Supplementary Table S1). The amplitude of mEPSCs, which is determined by the number of AMPAR per synapse, was not altered by C4 overexpression at any age examined (Fig. 1B; Supplementary Table S1). Furthermore, the decay time constant of NMDAR-mediated currents, which depends on the subunit composition of NMDARs, was similar in control and C4-OE mice of the same age group (Fig. 3C; Supplementary Table S1). Therefore, the increased AMPA/NMDA ratio in C4-OE neurons results from reduced NMDAR-mediated currents. Increased AMPA/NMDA ratio has been repeatedly associated with altered synaptic expression of the AMPAR GluA2 subunit [19, 20] that controls the calcium permeability of AMPARs [21, 22]. Therefore, we assessed the rectification of synaptic AMPAR-mediated currents which is sensitive to the presence of the GluA2 subunit. We found that the rectification index of evoked AMPAR currents was significantly decreased in juvenile and adult C4-OE mice, but not in pups (Fig. 3D, E; two-way ANOVA, $P < 0.0001$; juvenile: Sidak's test, $P < 0.001$; adulthood: Sidak's test, $P < 0.05$; Supplementary Table S1). This suggests that synaptic AMPARs in C4-OE neurons show reduced GluA2 subunit content, thus becoming more calcium-permeable, concomitantly with NMDAR hypofunction.

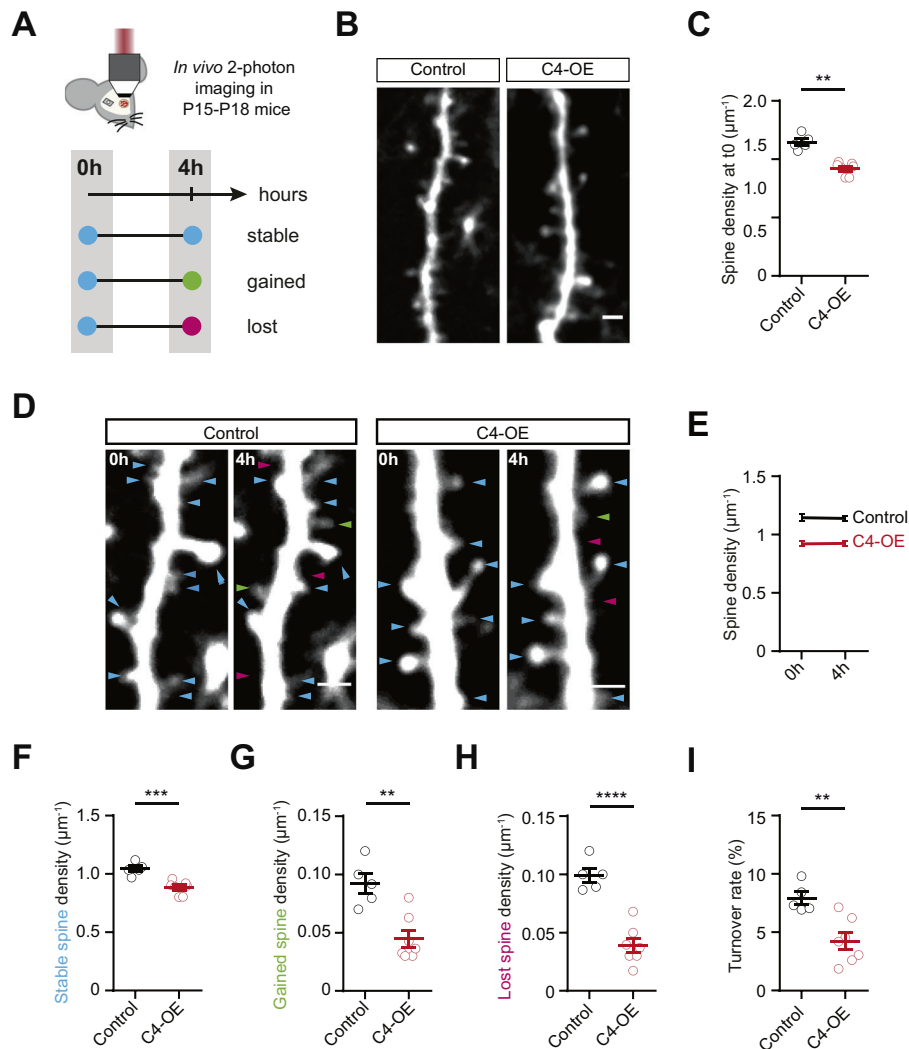


Fig. 2 Decreased spine turnover in young (P15–P18) C4-OE mice.

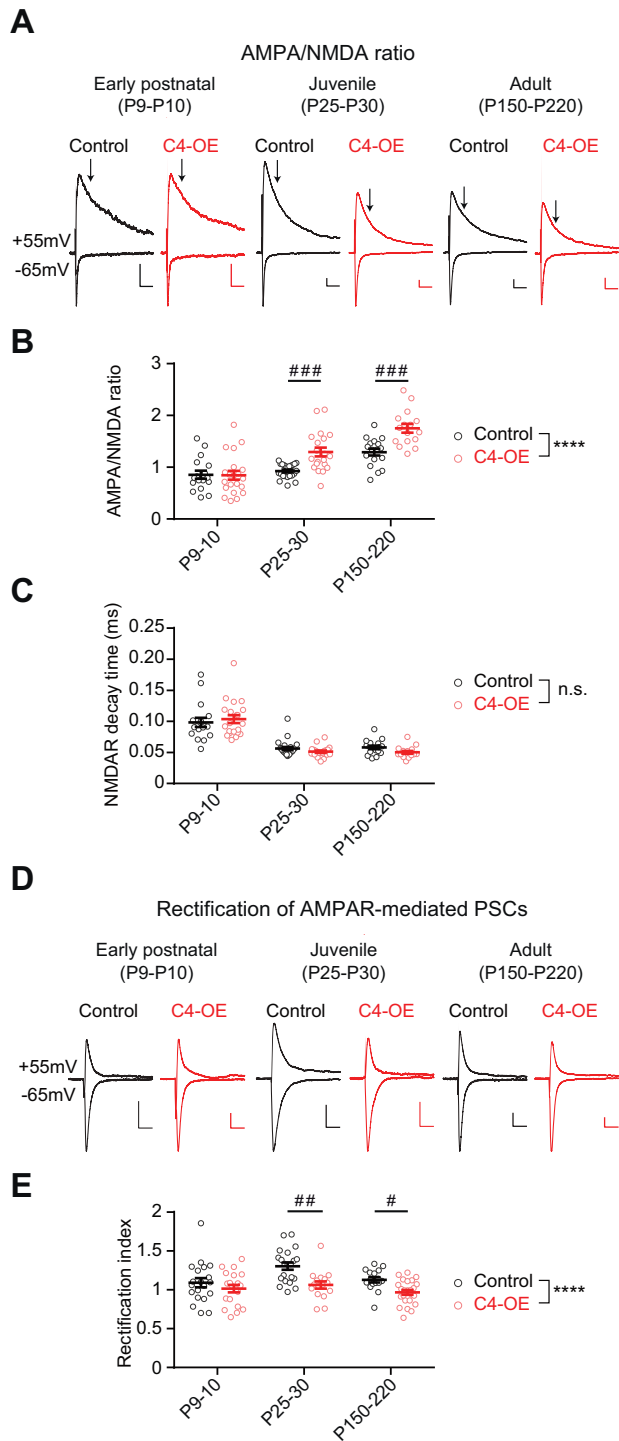
A Experimental timeline of in vivo two-photon imaging to investigate spine formation and elimination in electroporated pyramidal neurons. Spines already present at t_0 are in blue; spines that were stable, gained, or lost at $t_0 + 4$ h are in blue, green, and magenta, respectively. **B** Examples of apical dendrites from control and C4-OE electroporated pyramidal neurons imaged at t_0 ; scale bar: 2 μm . **C** Spine density at t_0 in tdTom⁺ pyramidal neurons (*T*-test, **** $P < 0.0001$; control: $n = 5$ mice; C4-OE: $n = 7$ mice). **D** Example images showing spine turnover from t_0 to $t_0 + 4$ h in control and C4-OE pyramidal cells; scale bar: 2 μm . **E** Evolution of the spine density between t_0 and $t_0 + 4$ h in

control and control and C4-OE pyramidal cells (control: $n = 5$ mice; C4-OE: $n = 7$ mice). **F–H** Stable, gained, and lost spine density in control and C4-OE neurons. C4-OE caused a significant reduction in the number of both gained and lost spines (stable spine: *T*-test, *** $P = 0.0007$; gained spines: *T*-test, ** $P = 0.0018$; lost spines: *T*-test, **** $P < 0.0001$; control: $n = 5$ mice; C4-OE: $n = 7$ mice). **I** Spine turnover in control and C4-OE dendrites. The turnover rate is decreased in C4-OE dendrites (Mann–Whitney test, ** $P = 0.0039$; control: $n = 5$ mice; C4-OE: $n = 7$ mice). All data are represented as mean \pm SEM. Each open circle represents an individual mouse.

C4 overexpression results in reduced GABAergic transmission

Abnormalities in GABAergic networks constitute another hallmark of the schizophrenic cortex. They include synaptic abnormalities as well as decreased expression of GAD67 in PV-expressing interneurons. We examined spontaneous inhibitory synaptic transmission in tdTom⁺ pyramidal cells from juvenile mice using a high chloride intracellular solution to maximize the signal/noise ratio.

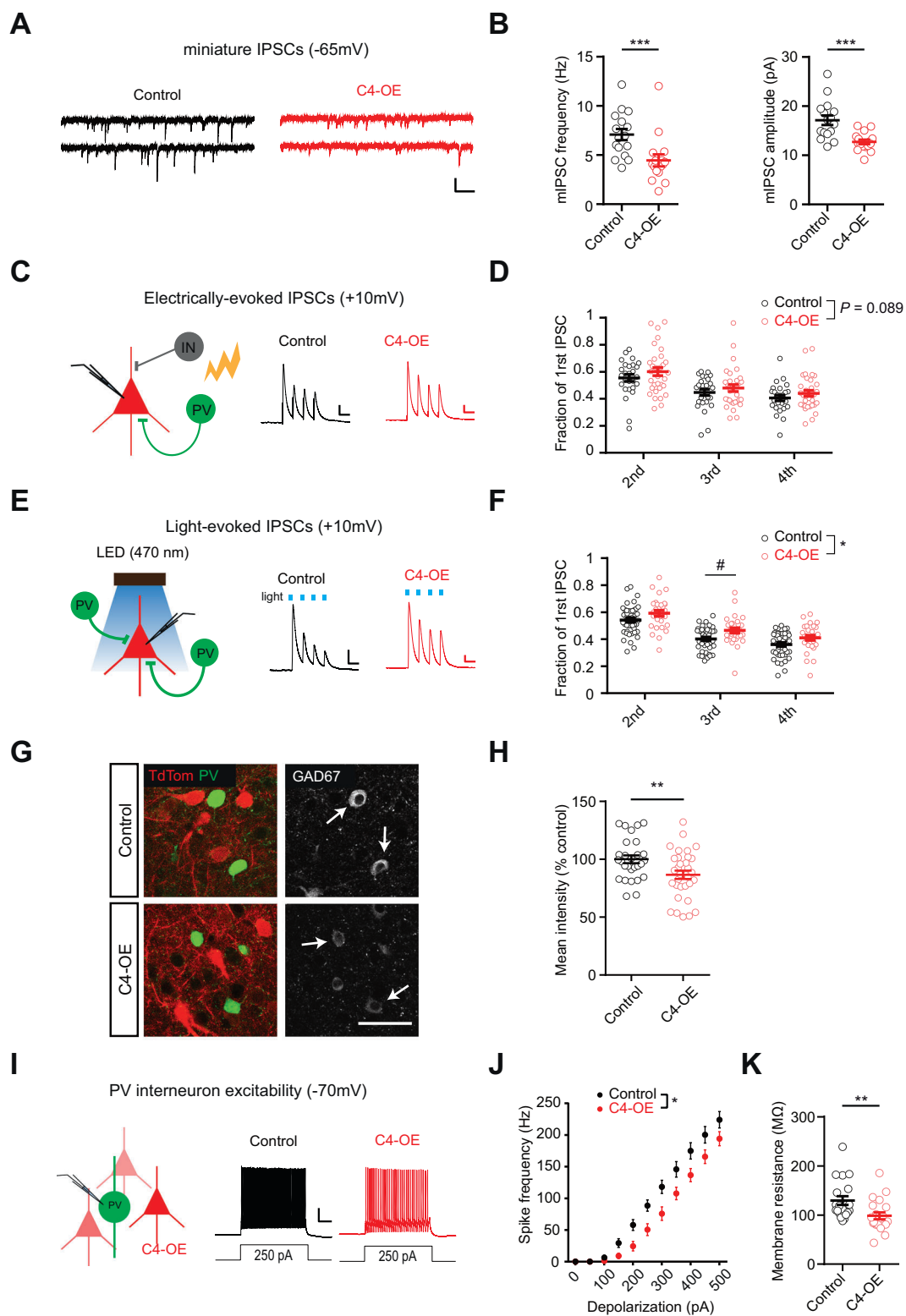
Both the frequency and amplitude of miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs) were significantly decreased in C4-OE neurons (Fig. 4A, B; frequency: Mann–Whitney test, $P = 0.0004$; amplitude: *T*-test, $P = 0.0003$; Supplementary Table S1). Reduced mIPSC frequency may result from decreased release probability from GABAergic terminals in the maternal immune activation (MIA) model of SZ [23] which has been associated with increased expression of complement C1q and C4 [24, 25]. We investigated GABA release probability using a



similar protocol [23]. IPSCs were evoked by four consecutive electrical stimuli delivered at 20 Hz while holding voltage-clamped tdTom+ pyramidal cells at a membrane potential of +10 mV (Fig. 4C). Short-term synaptic depression, which is sensitive to changes in release probability, showed a nonsignificant trend toward reduction in C4-OE neurons (Fig. 4D; RM two-way ANOVA,

Fig. 3 Altered AMPA/NMDA ratio and AMPAR rectification index in C4-OE mice. **A** Sample traces of evoked synaptic AMPA and NMDA currents recorded at -65 and $+55$ mV, respectively, in the presence of gabazine at three developmental stages. The NMDAR component was measured 50 ms after stimulation (arrows). The AMPAR component was measured as the peak of the evoked EPSC at -65 mV. Scale bars: 50 pA/50 ms. **B, C** AMPA/NMDA ratio and NMDA decay time throughout development in control and C4-OE pyramidal cells. The AMPA/NMDA ratio was increased in C4-OE neurons from juvenile and adult mice, but not from neonates. The decay time of NMDARs was not affected by C4-OE at any stage of development, indicating that C4-OE does not alter NMDAR subunit composition. This together with unchanged mEPSC amplitude in C4-OE mice (Fig. 2B) indicates that the increased AMPA/NMDA ratio reflects reduced NMDAR-mediated excitatory transmission in C4-OE pyramidal neurons (two-way ANOVA, main effect, **** $P < 0.0001$, Sidak's post hoc test, ### $P < 0.001$; n.s., not significant. Control: early postnatal, $n = 17$ cells from three mice; juvenile, $n = 23$ cells from four mice; adult, $n = 17$ cells from four mice; C4-OE: early postnatal, $n = 21$ cells from three mice; juvenile, $n = 20$ cells from five mice; adult, $n = 16$ cells from four mice). **D** Sample traces of evoked AMPA-mediated currents recorded at -65 and $+55$ mV at three developmental stages; scale bars: 50 pA/50 ms. **E** The rectification index of AMPAR-mediated currents was decreased in pyramidal cells from juvenile and adult C4-OE mice, suggesting the insertion of GluA2 subunit-lacking AMPAR at excitatory synapses (two-way ANOVA, **** $P < 0.0001$, Sidak's post hoc test, ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$. Control: early postnatal, $n = 20$ cells from three mice; juvenile, $n = 21$ cells from three mice; adult, $n = 17$ cells from four mice; C4-OE: early postnatal, $n = 20$ cells from three mice; juvenile, $n = 16$ cells from three mice; adult, $n = 24$ cells from three mice). All data are represented as mean \pm SEM. Each open circle represents an individual cell.

$P = 0.089$; Supplementary Table S1). In the MIA model, altered release probability from PV neurons, but not from other types of interneurons, has been inferred from optogenetic studies of short-term plasticity [23]. We reasoned that selectively activating the PV neuron-pyramidal cells synapse in C4-OE mice might allow to uncover significant differences in short-term depression. To test this hypothesis, we expressed channelrhodopsin-2 (ChR2) fused to YFP in PV-expressing interneurons using timed matings between lox-STOP-lox ChR2 mice and PV-Cre mice (Supplementary Fig. S5A). Pregnant females were electroporated at embryonic stage E15 either with a tdTomato-encoding plasmid (control group) or with tdTomato + C4 (C4-OE condition). To verify the specificity of ChR2 expression, we patched-clamped ChR2-YFP+ cells in the control group and recorded their firing pattern in response to a 500 ms pulse of blue light (470 nm). All tested ChR2-YFP cells exhibited the characteristic fast-spiking firing pattern of PV interneurons ($n = 3$ cells; Supplementary Fig. S5B). Light-evoked PSCs in pyramidal cells were blocked by gabazine, confirming their GABAergic nature (Supplementary Fig. S5C, D). Next, we assessed short-term depression of PV neuron IPSCs in pyramidal cells using four consecutive blue light pulses (0.5 ms) delivered at



20 Hz (Fig. 4E). We found that PV neuron-pyramidal cell synapses in C4-OE mice displayed significantly reduced short-term depression, consistent with decreased GABA release probability (Fig. 4F; RM two-way ANOVA, main

effect, $P = 0.014$; Supplementary Table S1). Thus, similar to the MIA model, decreased release probability from PV neurons may contribute to diminish GABAergic transmission onto pyramidal cells in C4-OE mice.

◀ **Fig. 4 Alterations of GABAergic networks in C4-OE mice.** **A** Sample traces of mIPSCs recordings at a holding potential of -65 mV in control and C4-OE pyramidal cells from juvenile mice (P25–P30); scale bars: 20 pA/100 ms. **B** Both mIPSC frequency and amplitude were decreased in C4-OE pyramidal cells (frequency: Mann–Whitney test $***P = 0.0004$; amplitude: T -test $***P = 0.0003$. Control: $n = 16$ cells from four mice; C4-OE: $n = 16$ cells from four mice). **C** Schematic drawing illustrating the electrical stimulation of GABAergic release onto electroporated pyramidal cells (left) and example traces of four consecutive eIPSCs evoked with 50 ms interpulse intervals, in control and C4-OE pyramidal cells (right); scale bars: 50 pA/50 ms. **D** Ratios of the second, third, and fourth eIPSC peak amplitude to the first eIPSC peak amplitude. Paired-pulse depression exhibited a trend toward being decreased in C4-OE neurons (two-way RM ANOVA, main effect, $P = 0.089$. Control: $n = 29$ cells from three mice; C4-OE: $n = 37$ cells from three mice). **E** Schematic drawing illustrating the optogenetic activation of PV neuron and resulting IPSC recorded in electroporated pyramidal cells (left); and example traces of four consecutive light-evoked IPSCs with 50 ms interpulse intervals in control and C4-OE pyramidal cells (right); scale bars: 50 pA/50 ms. **F** Ratios of the second, third, and fourth light-evoked IPSC peak amplitude to the first IPSC peak amplitude. The increased ratio in C4-OE pyramidal cells indicates reduced presynaptic GABA release at PV neuron-pyramidal cell synapses (two-way RM ANOVA, main effect, $*P = 0.014$, Sidak's post hoc test, $^{\#}P < 0.05$. Control: $n = 43$ cells from four mice; C4-OE: $n = 30$ cells from three mice). All data are represented as mean \pm SEM. Each open circle represents an individual cell. **G** Example of immunostainings for tdTomato/PV and GAD67 on PFC slices from control and C4-OE mice. Arrows indicate GAD67-expressing PV cells; scale bar: 20 μ m. **H** Mean intensity \pm SEM of GAD67 expression in PV+ cells. GAD67 expression in PV cells was decreased in C4-OE mice (T -test; $**P = 0.0094$; control: $n = 28$ mice; C4-OE: 33 mice). Each open circles represents an individual mouse. **I** Schematic drawing depicting the patch-clamp recording of a PV interneuron located in the vicinity of tdTomato pyramidal cells (left) and sample spike trains in PV interneurons evoked by a 250 pA somatic current injection in control and C4-OE mice in the presence of synaptic blockers (right); scale bars: 20 mV/100 ms. **J** PV interneurons exhibited reduced intrinsic excitability in C4-OE mice (two-way RM ANOVA, main effect, $*P = 0.013$. Control: $n = 20$ cells from three mice; C4-OE: $n = 21$ cells from four mice). **K** The input resistance of PV neurons was significantly decreased in C4-OE mice (Mann–Whitney test, $***P = 0.0024$. Control: $n = 20$ cells from three mice; C4-OE: $n = 21$ cells from four mice). Each open circle represents an individual cell.

C4 overexpression in pyramidal cells causes reduced input resistance, decreased excitability, and lower GAD67 expression in PV neurons

The availability of presynaptic GABA is one of the factors determining release probability. GAD67 is an enzyme responsible for basal cortical GABA synthesis [26], and reduced expression of GAD67, especially in PV cells, has been found in postmortem cortical tissue from schizophrenic patients in multiple studies [14, 27]. In mouse models, reducing GAD67 expression in PV neurons decreases both the frequency of spontaneous inhibitory currents [28] and the amplitude of evoked GABAergic currents in pyramidal cells [29]. Therefore, we measured GAD67 expression in PV interneurons located in the vicinity of control or C4-OE tdTom+ pyramidal cells. As

GAD67 is expressed in both presynaptic terminals and in the cell soma, we quantified GAD67 expression in the clearly delineated cell soma (Fig. 4G) [23]. GAD67 expression in PV cells was significantly lower in C4-OE mice than in control mice (mean intensity compared to control, T -test, $P = 0.0094$; Fig. 4H; Supplementary Table S2). These results suggest that reduced GABA synthesis may contribute to the deficit in GABAergic transmission at PV neuron-pyramidal cell synapses in C4-OE mice. It has been proposed that reduced expression of activity-dependent biomarkers, including GAD67, in PV neurons, may result from decreased PV neuron activity in the schizophrenic cortex [14]. We investigated the number and distribution of PV neurons in the cortex of C4-OE juvenile mice and found that they were not altered (Supplementary Fig. S6; Supplementary Table S2). We then electroporated C4 + tdTomato or tdTomato alone in PV-Cre::RCE mice which express EGFP selectively in PV neurons. We patch-clamped EGFP+ PV neurons located in the vicinity of tdTom+ pyramidal cells, in control and C4-OE mice aged P25–P30 (Fig. 4I). The intrinsic excitability of PV neurons, i.e., their propensity to fire action potentials when subjected to an input current in the presence of drugs blocking synaptic transmission, was significantly diminished in the C4-OE condition (Fig. 4J; RM two-way ANOVA, main effect $P = 0.013$; Supplementary Table S3). This was associated with lower input resistance of PV cells (Fig. 4K; Mann–Whitney test, $P = 0.0024$; Supplementary Table S3), in the absence of significant changes in cell capacitance or resting membrane potential (Supplementary Fig. S7A, B; Supplementary Table S3).

C4 overexpression results in increased excitatory input on PV neurons

Since synaptic inputs also contribute to neuronal excitability, we recorded miniature excitatory and inhibitory inputs (mEPSCs and mIPSCs) in EGFP+ PV neurons. We observed a significant increase in mEPSC frequency, and a trend toward increased mEPSC amplitude, in the C4-OE condition (Supplementary Fig. S7C, D; frequency: Mann–Whitney test, $P = 0.018$; amplitude: Mann–Whitney test, $P = 0.069$; Supplementary Table S3). The paired-pulse ratio of evoked EPSCs in PV neurons remained unchanged (Supplementary Fig. S7E, F; Table S3). Neither the frequency nor the amplitude of mIPSCs was changed following C4 overexpression in pyramidal cells (Supplementary Fig. S7G, H; Supplementary Table S3). Thus, in contrast to C4-OE pyramidal cells, PV neurons exhibit increased excitatory input in C4-OE mice.

Working memory deficits in C4-OE mice

Finally, we investigated whether the changes that we observed at the cellular level may result in long-lasting behavioral alterations in C4-OE mice. In SZ, deficits in working memory

are central to cognitive impairments and appear to result, at least in part, from abnormalities in PFC function [30, 31]. Therefore, we asked whether increased C4 expression in the PFC alters working memory. Since classical working memory tests rely on locomotion, we first verified that control and C4-OE mice showed comparable spontaneous locomotor activity in an actimeter (Fig. 5A; Supplementary Table S4). Spontaneous activity of C4-OE mice also did not differ from control mice in the open field assay (Fig. 5B; Supplementary Table S4). We then used two different tests of working memory, namely the odor span test and the spatial span test. C4-OE mice performed equally well as control mice during the acquisition of the nonmatching to sample task, in which mice learned to associate the presence of a new odor and food reward (Fig. 5C–E; Supplementary Table S4). In the subsequent span tests, however, when mice had to remember an increasing number of odors or positions to obtain the reward, C4-OE mice exhibited reduced working memory capacity compared to control mice (Fig. 5F–I; odor span: Mann–Whitney test, $P = 0.0022$; spatial span: Mann–Whitney test, $P = 0.045$; Supplementary Table S4). Taken together, these results indicate that working memory is impaired in C4-OE mice, in line with neuronal abnormalities in PFC networks.

Discussion

GWAS have provided unprecedented identification of predisposing genetic risk factors in SZ. High expression variants of the C4 gene contribute to the strong association between SZ and a genomic region within the MHC locus on chromosome 6 in GWAS [4, 5]. Here, we show that overexpressing C4 in the mouse PFC recapitulates several cortical phenotypes associated with SZ, including synapse loss, decreased NMDAR-mediated neurotransmission, impaired function of GABAergic circuits, and deficits in working memory (Supplementary Fig. S8).

Decreased spine turnover in C4-OE mice

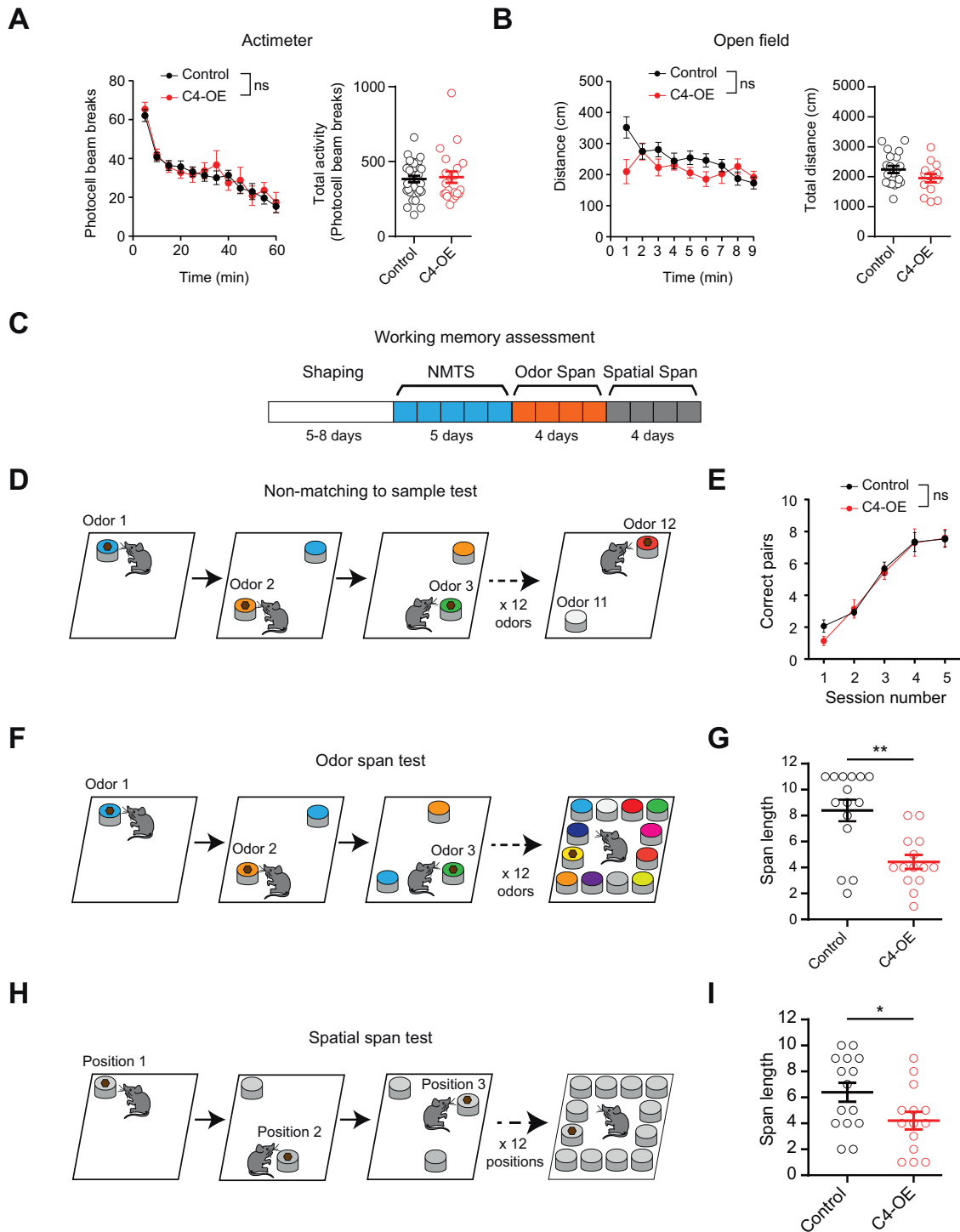
Elevated expression of C4 in neurons enhances microglia-mediated synaptic engulfment [10–12]. Our *in vivo* imaging results clearly show an overall decrease in gained and lost dendritic spines in juvenile mice as a consequence of C4 overexpression. This apparent discrepancy may reflect an underappreciated role of complement in regulating spine formation or immature spine stabilization. The decrease in spine turnover observed in our model could be due to excessive microglial phagocytosis of the synapses in formation or just formed, preventing their stabilization. The disappearance of these spines in less than 4 h, the time window used for our time-lapse two-photon microscopy acquisitions would thus result in decreased spine gain.

Time course of synaptic deficits in C4-OE mice

It is noteworthy that the decrease in excitatory input to C4-OE neurons is not present at the early stages of postnatal development, but only appears between P10 and P25, a period of strong synaptic remodeling in the cortex. This may be relevant for the pathophysiology of SZ, a disorder in which even the earliest prodromal symptoms occur at a relatively late stage of postnatal development. The reduction in NMDAR-mediated transmission is concomitant with the loss of functional excitatory synapses in C4-OE mice, suggesting that C4 overexpression may selectively impair the formation or maintenance of “weak” (high NMDAR, low AMPAR) synapses in juvenile mice. Another study reported that synaptic deficits were accompanied by a decrease in cellular capacitance in C4-OE pyramidal cells [11]. We found that cell capacitance was unchanged following C4-OE. While we cannot exclude that different experimental settings account for this difference, the absence of significant changes in capacitance may be in line with the unchanged morphology of C4-OE pyramidal neurons [11]. We show that synaptic deficits persist into adulthood in C4-OE mice. Our immunohistochemistry results indicate that C4 is still overexpressed in the PFC of adult C4-OE mice, suggesting that increased C4 expression may persistently affect spine turnover in C4-OE mice. However, since synaptic refinement is particularly pronounced in the developing cortex [16, 17], it is likely that elevated expression of C4 predominantly affects circuit remodeling in juvenile mice.

GABAergic network abnormalities

While another study did not detect significant changes in the inhibitory input to C4-OE pyramidal cells [11], we observed a significant reduction in mIPSC frequency and amplitude. This discrepancy may be due to the higher driving force for chloride ions at hyperpolarized membrane potentials, and hence improved signal/noise ratio of IPSC recordings, in our experimental conditions of high intracellular chloride. We also show that C4-OE in pyramidal cells decreases GABA release from PV neurons onto pyramidal cells, consistent with decreased GAD67 expression in PV neurons and reduced PV neuron excitability. The cause of the well-substantiated decrease in GAD67 cortical expression in SZ is unclear. It has been hypothesized that lower activity of layer II/III pyramidal cells, possibly due to their reduced number of dendritic spines, could result in fewer excitatory inputs onto PV cells (for instance through lower neuronal activity-regulated pentraxin secretion from pyramidal cells), leading to reduced PV neuron excitation and hence decreased activity-dependent GAD67 expression [14, 32]. In C4-OE mice, reduced GAD67 expression in PV neurons may result from altered intrinsic properties of PV neurons as



a consequence of homeostatic adaptation to reduced network activity, rather than from decreased synaptic excitatory input. Indeed, we show that PV neuron excitability is impaired in C4-OE mice, while increased mEPSC frequency in PV neurons indicates that PV neurons are spared from excitatory synapse loss associated with C4 overexpression in pyramidal cells.

Linking neural dysfunctions and cognitive impairment in C4-OE mice

Cognitive dysfunction is a central feature of SZ that is not treated by current pharmacotherapy and determines the functional outcome of the illness [33]. Impaired working memory has been proposed to be central in the cognitive

◀ **Fig. 5 Impaired working memory in C4-OE mice.** **A** Locomotor activity measured at weaning in an actimeter, in control ($n = 32$ mice) and C4-OE male mice ($n = 21$ mice). Each dot represents spontaneous activity averaged over a period of 5 min. **B** Locomotor activity measured 1 week after weaning in the open field, in control ($n = 20$ mice) and C4-OE mice ($n = 14$ mice). **C** Timeline of working memory tests. Animals were first trained to dig into scented sawdust to find a reward pellet (shaping) before learning a nonmatching to sample (NMTS) task, followed by 4 days of odor span test, and 4 days of spatial span test. **D** NMTS test procedure. Mice were exposed to pairs of odors and learned to associate a new odor with a reward. **E** Performance in the NMTS odor test was similar in control and C4-OE mice (Control: $n = 15$ mice; C4-OE: 14 mice). **F** Mice were exposed to an increasing number of odors in the odor span test. **G** Working memory capacity in the odor span test is impaired in C4-OE mice (Control: $n = 15$ mice; C4-OE: 14 mice; Mann–Whitney test, $**P = 0.0022$). **H** Mice were exposed to an increasing number of positions in the spatial span test. **I** Working memory capacity in the spatial span test is also affected in C4-OE mice (Control: $n = 15$ mice; C4-OE: 14 mice; Mann–Whitney test, $*P = 0.0448$). All data are represented as mean \pm SEM. Each open circle represents an individual mouse.

impairments associated with SZ [30, 31]. Spine loss, reduced NMDAR transmission, and PV neuron dysfunction in the PFC may all contribute to impair working memory. For example, decreased cortical connectivity in SZ has repeatedly been associated with working memory deficits [34]. Decreased synapse density in layer II/III may particularly affect connectivity, since layer II/III pyramidal cells make major contributions to cortico-cortical connections, including callosal connections, and therefore integrate information across cortical areas and hemispheres. Furthermore, blocking NMDA, but not AMPA, receptors during a working memory task abolishes persistent activity in prefrontal neurons [35]. Finally, PV neurons contribute to the mechanisms underlying working memory [36], in line with the well-established role of PV neurons in the generation of fast, gamma frequency oscillations in neocortex [37, 38]. Our results suggest that these distinct alterations occur together during development as a consequence of elevated C4 expression, making it difficult to attribute cognitive dysfunction to a single one of them. The combination of reduced connectivity, NMDAR hypofunction, and altered PV neuron function might collectively modify the dynamics of specific attractors, which are thought to be the substrate for persistent neural activity underlying short-term memory [39, 40].

Conclusion

Decreased spine density, reduced NMDAR function, and alterations in GABAergic networks have been associated with SZ. We show that elevated C4 expression in PFC pyramidal cells results in functional alterations that are consistent with these SZ-associated phenotypes, and causes

working memory impairment, a characteristic feature of cognitive deficits in SZ. In particular, we propose that the persistent decrease in NMDAR-mediated neurotransmission in C4-OE mice might be the consequence of impaired stabilization of immature synapses. This could provide a conceptual framework to relate the hypotheses of excessive synaptic pruning and NMDAR hypofunction in SZ.

Acknowledgements MD was the recipient of fellowships from Sorbonne University and from FRM/Venite Cantemus (FDT20190400802). The project was supported by funds from the Investissements d’Avenir program under reference ANR-11-IDEX-0004-02 to CLM and RT, the Emergence program of Sorbonne University to CLM, and from an ERANET Neuron Grant to RT (ANR-18-0008-01), MF (BMBF 01EW1905), and CLM (ANR-18-0008-02). The authors thank Dr. L. Maroteaux, Dr. P. Gaspar, and Dr. J.-C. Ponce for critically reading the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

1. Purcell SM, Wray NR, Stone JL, Visscher PM, O’Donovan MC, Sullivan PF, et al. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature*. 2009;460:748–52.
2. Shi J, Levinson DF, Duan J, Sanders AR, Zheng Y, Pe’er I, et al. Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia. *Nature*. 2009;460:753–7.
3. Stefansson H, Ophoff RA, Steinberg S, Andreassen OA, Cichon S, Rujescu D, et al. Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature*. 2009;460:744–7.
4. Ripke S, Neale BM, Corvin A, Walters JT, Farh KH, Holmans PA, et al. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*. 2014;511:421–7.
5. Sekar A, Bialas AR, de Rivera H, Davis A, Hammond TR, Kamitaki N, et al. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature*. 2016;530:177–83.
6. Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, et al. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*. 2007;131:1164–78.
7. Glantz LA, Lewis DA. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2000;57:65–73.
8. Feinberg I. Schizophrenia: caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? *J Psychiatr Res*. 1982;17:319–34.
9. Prasad KM, Chowdari KV, D’Aiuto LA, Iyengar S, Stanley JA, Nimgaonkar VL. Neuropil contraction in relation to complement C4 gene copy numbers in independent cohorts of adolescent-onset and young adult-onset schizophrenia patients—a pilot study. *Transl Psychiatry*. 2018;8:134.
10. Sellgren CM, Gracias J, Wamuff B, Biag JD, Thanos JM, Whittredge PB, et al. Increased synapse elimination by microglia in schizophrenia patient-derived models of synaptic pruning. *Nat Neurosci*. 2019;22:374–85.
11. Comer AL, Jinadasa T, Sriram B, Phadke RA, Kretsge LN, Nguyen TPH, et al. Increased expression of schizophrenia-

- associated gene C4 leads to hypoconnectivity of prefrontal cortex and reduced social interaction. *PLoS Biol.* 2020;18:e3000604.
12. Yilmaz M, Yalcin E, Presumey J, Aw E, Ma M, Whelan CW, et al. Overexpression of schizophrenia susceptibility factor human complement C4A promotes excessive synaptic loss and behavioral changes in mice. *Nat Neurosci.* 2021;24:214–24.
 13. Balu DT. The NMDA receptor and schizophrenia: from pathophysiology to treatment. *Adv Pharm.* 2016;76:351–82.
 14. Diemel SJ, Lewis DA. Alterations in cortical interneurons and cognitive function in schizophrenia. *Neurobiol Dis.* 2019;131:104208.
 15. Coiro P, Padmashri R, Suresh A, Spartz E, Pendyala G, Chou S, et al. Impaired synaptic development in a maternal immune activation mouse model of neurodevelopmental disorders. *Brain Behav Immun.* 2015;50:249–58.
 16. Zuo Y, Lin A, Chang P, Gan WB. Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron.* 2005;46:181–9.
 17. Holtmaat AJ, Trachtenberg JT, Wilbrecht L, Shepherd GM, Zhang X, Knott GW, et al. Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron.* 2005;45:279–91.
 18. Pfeiffer T, Poll S, Bancelin S, Angibaud J, Inavalli VK, Keppler K, et al. Chronic 2P-STED imaging reveals high turnover of dendritic spines in the hippocampus in vivo. *eLife.* 2018;7:e34700.
 19. Bellone C, Luscher C. Cocaine triggered AMPA receptor redistribution is reversed in vivo by mGluR-dependent long-term depression. *Nat Neurosci.* 2006;9:636–41.
 20. Wang HX, Gao WJ. Development of calcium-permeable AMPA receptors and their correlation with NMDA receptors in fast-spiking interneurons of rat prefrontal cortex. *J Physiol.* 2010;588:2823–38.
 21. Hollmann M, Hartley M, Heinemann S. Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science.* 1991;252:851–3.
 22. Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, et al. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron.* 1995;15:193–204.
 23. Canetta S, Bolkan S, Padilla-Coreano N, Song LJ, Sahn R, Harrison NL, et al. Maternal immune activation leads to selective functional deficits in offspring parvalbumin interneurons. *Mol Psychiatry.* 2016;21:956–68.
 24. Duchatel RJ, Meehan CL, Harms LR, Michie PT, Bigland MJ, Smith DW, et al. Increased complement component 4 (C4) gene expression in the cingulate cortex of rats exposed to late gestation immune activation. *Schizophr Res.* 2018;199:442–44.
 25. Han M, Zhang JC, Hashimoto K. Increased levels of C1q in the prefrontal cortex of adult offspring after maternal immune activation: prevention by 7,8-dihydroxyflavone. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 2017;15:64–7.
 26. Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding RG, Kanbara N, et al. Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:6496–9.
 27. Hashimoto T, Volk DW, Eggan SM, Mirnics K, Pierri JN, Sun Z, et al. Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *J Neurosci.* 2003;23:6315–26.
 28. Brown JA, Ramikie TS, Schmidt MJ, Baldi R, Garbett K, Everheart MG, et al. Inhibition of parvalbumin-expressing interneurons results in complex behavioral changes. *Mol Psychiatry.* 2015;20:1499–507.
 29. Fujihara K, Miwa H, Kakizaki T, Kaneko R, Mikuni M, Tanahira C, et al. Glutamate decarboxylase 67 deficiency in a subset of GABAergic neurons induces schizophrenia-related phenotypes. *Neuropsychopharmacology.* 2015;40:2475–86.
 30. Silver H, Feldman P, Bilker W, Gur RC. Working memory deficit as a core neuropsychological dysfunction in schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 2003;160:1809–16.
 31. Silver H, Feldman P. Evidence for sustained attention and working memory in schizophrenia sharing a common mechanism. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2005;17:391–8.
 32. Hoftman GD, Datta D, Lewis DA. Layer 3 excitatory and inhibitory circuitry in the prefrontal cortex: developmental trajectories and alterations in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2017;81:862–73.
 33. Kahn RS, Keefe RS. Schizophrenia is a cognitive illness: time for a change in focus. *JAMA Psychiatry.* 2013;70:1107–1112.
 34. Cao H, Dixon L, Meyer-Lindenberg A, Tost H. Functional connectivity measures as schizophrenia intermediate phenotypes: advances, limitations, and future directions. *Curr Opin Neurobiol.* 2016;36:7–14.
 35. Wang M, Yang Y, Wang CJ, Gamo NJ, Jin LE, Mazer JA, et al. NMDA receptors subserve persistent neuronal firing during working memory in dorsolateral prefrontal cortex. *Neuron.* 2013;77:736–49.
 36. Rossi MA, Hayrapetyan VY, Maimon B, Mak K, Je HS, Yin HH. Prefrontal cortical mechanisms underlying delayed alternation in mice. *J Neurophysiol.* 2012;108:1211–22.
 37. Cardin JA, Carlen M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K, et al. Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature.* 2009;459:663–7.
 38. Uhlhaas PJ, Singer W. Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nat Rev Neurosci.* 2010;11:100–13.
 39. Brody CD, Romo R, Kepecs A. Basic mechanisms for graded persistent activity: discrete attractors, continuous attractors, and dynamic representations. *Curr Opin Neurobiol.* 2003;13:204–11.
 40. Inagaki HK, Fontolan L, Romani S, Svoboda K. Discrete attractor dynamics underlies persistent activity in the frontal cortex. *Nature.* 2019;566:212–7.

Supplementary Information

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Rat monoclonal anti-HA	Sigma	Cat# 11867431001; RRID: AB_390919
Rabbit anti-Parvalbumin	Swant	Cat# PV27; RRID: AB_2631173
Mouse monoclonal anti-Glutamate Decarboxylase 67	Millipore-Merk	Cat# G5419; RRID: AB_261978
Goat anti-rat Alexa Fluor 488	Invitrogen	Cat# A-11006; RRID: AB_2534074
Donkey anti-rabbit Cy3	Jackson ImmunoResearch	Cat# 711-165-152; RRID: AB_2307443
Goat anti-mouse Alexa Fluor 647	Jackson ImmunoResearch	Cat# 115-605-003; RRID: AB_2338902
Chicken anti-GAPDH	Millipore-Merk	Cat# AB2302; RRID: AB_10615768
Rabbit anti-C4 alpha Chain	Proteintech	Cat# 22233-1-AP; RRID: AB_2879042
Goat anti-chicken IR700	Advansta	Cat# R-05057-250; RRID: N/A
Goat anti-rat IR800	Advansta	Cat# R-05064-250; RRID: N/A
Goat anti-rabbit IR700	Invitrogen	Cat# 35568; RRID: AB_2633284
DNA and Plasmids		
C4b mouse sequence	NCBI Resources	NM_009780.2
pCAG-HAC4b	This paper	N/A
pCAG-TdTomato	This paper	N/A
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse: C57Bl6/J	Janvier Labs	C57BL/6JRj
Mouse: PV-Cre (B6;129P2-Pvalb ^{tm1(cre)Arbr/J})	The Jackson Laboratory	JAX: 017320
Mouse: ChR2-YFP-loxP (B6;129S-Gt(ROSA) ^{26Sortm32(CAG-COP4*H134R/EYFP)Hze/J})	The Jackson Laboratory	JAX: 012569
Mouse: RCE-loxP (Gt(ROSA) ^{26Sortm1.1(CAG-EGFP)Fsh/Mnjjax})	The Jackson Laboratory	JAX : 032037
Software and Algorithms		
GraphPad Prism	https://www.graphpad.com/	RRID: SCR_002798
ImageJ	https://imagej.nih.gov/ij/	RRID: SCR_003070
MiniAnalysis	http://www.synaptosoft.com/MiniAnalysis/	RRID: SCR_002184
IgorPro	https://www.wavemetrics.com/	RRID: SCR_000325
PatchMaster	http://www.heka.com/products/products_main.html#soft_pm	RRID:SCR_000034
NeuroMatic	http://www.neuromatic.thinkrandom.com/	RRID:SCR_004186
Imetronic	http://www.imetronic.com/	N/A
Viewpoint	https://viewpoint.fr/en/p/software/videotrack	N/A
Image Studio Lite	https://www.licor.com/bio/image-studio-lite/	RRID: SCR_013715

Materials and methods

Animals

All animal experiments were performed according to guidelines of the European Community for the use of animals in research and were approved by the local ethical committees (C2EA-05 in France; LANUV NRW in Germany). All experiments were performed on mice that had been electroporated at embryonic stage E15. Mice were housed in their home cages and kept under a 12-h light/dark cycle at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Food and water were available ad libitum. For optogenetics experiments, we used electroporated transgenic $\text{Pvalb}^{\text{tm1(cre)Arbr}} (+/-)::\text{ChR2(H134R)-YFP(lox/-)}$ mice obtained after crossing homozygous $\text{Pvalb}^{\text{tm1(cre)Arbr}}$ (JAX n°017320) females expressing Cre recombinase under the control of the Pvalb promoter (kindly provided by Dr JC Poncer, Institut du Fer à Moulin, Paris) and homozygous lox-STOP-lox ChR2-YFP males (JAX n°012569) (kindly provided by Dr MC Angulo, Institute of Psychiatry and Neuroscience, Paris). To identify and patch-clamp PV interneurons ex vivo, we used PV-Cre mice crossed with RCE:LoxP reporter mice (JAX n°010701) expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP) under the control of the endogenous Gt(ROSA)26Sor promoter/enhancer regions and the CAG promoter. All mice were on a C57Bl/6J background. Females and males were used indifferently for electrophysiology, immunohistochemistry and imaging experiments. Only males were used for behavioral experiments.

DNA plasmid constructs

pCAG-HAC4 expression vector design was based on pCAG-HT2B-HA. The pCAG-HT2B-HA was a gift from I Moutkine (Fer à Moulin Institute, Paris). The HT2B gene was removed and replaced by the full coding sequence for murine C4b (NM_009780.2). The cDNA of C4b was obtained by reverse transcription PCR of total RNA from whole brain of adult 129S1/SvImJ mice. An HA tag was introduced at the N-terminus of the C4b sequence to allow the identification of the overexpressed C4 peptide. pCAG-tdTomato expression vector design was based on pCAG-mGFP which was a gift from Dr. C. Cepko¹ (Addgene plasmid # 14757). mGFP was replaced by tdTomato in the pCAG backbone. Subcloning of C4b and tdTomato sequences were done using InFusin (Clontech) and DNA were purified with Nucleospin kit (Macherey-Nagel). All constructs were verified by sequencing the entire coding region of the inserts.

***In utero* electroporation**

Pregnant mice at E15 were anesthetized by isoflurane 4% and were injected with Flunixin (0.05mg/kg body weight) before surgery. The surgery was performed under isoflurane 2% on a heated blanket and breathing was carefully monitored during all the procedure.

A midline laparotomy was performed and the uterine horns were exposed and moistened with sterile NaCl 0.9%. 0.5 μ l to 1 μ l of a DNA solution containing pCAG-C4HA and pCAG-tdTomato at a molar ratio of 4:1 (final DNA concentration of 0.8 μ g/ μ l) was pressure injected into the lateral ventricle of each embryo through a glass pipette made from a microcapillary tube (#5-000-1001-X10, Drummond Scientific). In the control condition, a solution containing pCAG-TdTomato (0.8 μ g/ μ l) alone was injected. The injected plasmid solution contained Fast Green (0.1%) to monitor the injection. The embryo's head in the uterus was held between the tweezers-type electrode consisting of two 5 mm diameter disc electrodes (CUY650P5, Nepagene). The cathode was placed just above the olfactory bulbs and the anode was placed at the back of the head below the cerebellum. Electrical pulses (50V; 50 ms) were applied five times at intervals of 950 ms with an electroporator (CUY21 Edit, Nepagene). The uterine horn was placed back into the abdominal cavity. The abdominal cavity was filled up with sterile NaCl 0.9% and the abdominal muscle and skin were sutured separately. After recovery, pregnant mice were returned to their home cage and sutures were examined every day until birth. Correct tdTomato expression was first checked through the intact skin shortly after birth (age P1-P2) and confirmed *post mortem* on brain slices from each experimental animal. Mice without tdTomato expression in the prefrontal cortex (PFC) were excluded from the analysis. Control and C4-OE electroporations were carried out in parallel (either on the same day or during the same week) in order to minimize experimental biases. The survival rate of electroporated control and C4-OE mice was comparable.

Cranial window surgery

At postnatal day 15 to 18 (P15-18) (and P30 respectively) a cranial window surgery was performed as previously described²⁻⁴. Mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamin/xylazin (0.13/0.01 mg/g body weight). For analgesia an additional subcutaneous injection of buprenorphin (0.05 mg/kg) was given. The anesthetic profile was deepened and maintained by inhalation of isoflurane (0.2-0.4% in 0.2 l/min oxygen). After the withdrawal reflex of the hind limb had subsided, the surgery begun. The eyes were covered with eye ointment (Bepanthen) to prevent drying and the mouse was placed on a heating pad to maintain body temperature. Subsequently, mice were fixed to a stereotactic frame and the

skin of the head was disinfected with 70% ethanol. The skin above the skull was removed using surgical scissors. To assure correct placement of the cranial window, the expression of the fluorophore was located using a UV light source. Next, the skull bone was dried and a 3 to 4-mm-diameter circular piece of bone was removed (3 mm at P15-P18, 4 mm at P30) over the prefrontal cortex using a dental drill. The dura mater was carefully removed and a circular coverslip (\varnothing 3mm at P15-P18, \varnothing 4 mm at P30) was inserted into the craniotomy and glued to the bone. The window was placed unilaterally above the electroporated hemisphere with the following coordinates describing the center of the circular glass (anteroposterior: +2mm, mediolateral: + or - 2mm (P30) and anteroposterior: +1.5 mm, mediolateral: + or - 1.5mm (P15-18). To allow stable and repetitive fixation of the mouse under the microscope, a small metal bar was attached next to the cortical window using UV-curable dental adhesive.

Two-photon *in vivo* imaging and analysis

Two-photon imaging was performed right after surgery at a Zeiss 7 multiphoton microscope with a Zeiss 20 x objective (NA = 1). The anesthesia was maintained with 1-1.5% inhalation of isoflurane while the mouse was head fixed to a custom-made imaging frame. 2P imaging was performed spanning a depth of 20-200 μm from the brain surface. This allowed us to image the full length of apical dendrites of Layer II/III pyramidal neurons. TdTomato fluorescence was excited at 980 nm using an InSight X3 tunable laser (Spectra-Physics) and collected through a 617/73 band-pass filter on a highly sensitive non-descanned detector. First, a 600 μm (x) x 600 μm (y) x 400 μm (z) overview z-stack (4 μm z-spacing) was acquired to retrieve the region of interest over multiple sessions. Then z-stacks of single dendrites (1 μm z-spacing) with a pixel size of 0.089 μm were acquired. After the first imaging session, the mice woke up and were placed in a cage with their littermates for 4-5 h (P15-18). For the second imaging session the mice were again anesthetized with isoflurane (initially 3%, then 1-1.5% for anesthesia maintenance) and imaged to retrieve the same dendritic structures recorded in the first imaging session.

Datasets were blinded prior to analysis by an experimenter not involved in the image analysis. In each animal 4-19 dendrites of 30-120 μm length were analyzed. Spines that extended out laterally from the dendritic shaft were counted manually by scrolling through the z-stack, as previously described⁵. Spine density was calculated by the number of spines divided by the length of the respective dendrite. Turnover of dendritic spines was calculated as follows: turnover [%] = $100 * ((\#gained + \#lost) / (\#T1 + \#T2))$. Here, #gained refers to the number of

gained and #lost to the number of lost spines, respectively and #T1 and #T2 to the number of all spines at time-points T1 and T2, respectively. T1 and T2 refer to 0h and 4h.

Confocal imaging of dendritic spines and analysis

Tissue preparation and immunochemistry

All mice were injected with a lethal dose of pentobarbital (200 mg/kg) and perfused transcardially with saline solution followed by 4% (w/v) paraformaldehyde in phosphate buffered saline. Brains were removed, post-fixed in 4% paraformaldehyde for 20 hours, and then sectioned at 50 μm in the coronal plane using a vibratome (VT1200, Leica). Sections were mounted (Dako Fluorescence mounting medium) directly on coverslips for confocal imaging.

Fixed tissue imaging

Images of fixed brain slices were acquired on a commercial confocal microscope equipped with an Airyscan detector (Zeiss LSM800, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany), using a 63X/1.4NA oil objective. Excitation of tdTomato was achieved by a 561nm laser and emission was collected using a 565-700 nm bandpass filter. Image stacks of dendrite fragments of pyramidal neurons were acquired with a pixel size of 0.049 μm , a z-step size of 0.200 μm and at a scan speed of 2.55 $\mu\text{s}/\text{pixel}$. Images acquired with the Airyscan detector were processed by the ZEN software internal algorithm that reassigns the collected pixels to their correct positions to achieve a super-resolution image; for this a super-resolution threshold of 2 was used.

Reconstruction of dendritic fragments

Image stacks were 3D reconstructed in IMARIS x64 8.1.2 (Bitplane AG, Zurich). Basal and apical dendrites and their associated spines were reconstructed semi-automatically using the Filament Tracer module. Spines that extended radially from the dendrite in three dimensions were drawn manually by turning the 3D visualized dendritic fragment.

Filament parameters, that is small diameter = 0.08 μm , large diameter = 0.80 μm and contrast threshold = 0.10 were defined empirically by measuring a random set of acquired images and comparing the rendered filament with the preprocessed image. Spine density per dendritic fragment and morphological parameters of spines (ratio of mean head to neck diameter, maximum head diameter and spine length) were measured, exported for further analysis (Cluster analysis) and plotted in a 3D graph.

Cluster analysis

The cluster analysis was performed as previously described⁶. The spine parameters, ratio of the mean head to neck diameters ($\text{ØHead}/\text{ØNeck}$), the maximum head diameter (Ømax Head) and spine length were taken into account. Agglomerative Hierarchical Clustering Analysis (AHC) was performed using Python's scikit-learn toolbox. Before cluster analysis, the parameters were centered and scaled to unit variance using the standard scaler from Python's scikit-learn toolbox. AHC dissimilarity level was calculated based on Euclidean distance. Agglomeration was performed using Ward's method. By fitting the hierarchical clustering to the population of all analyzed spines we identified three clusters.

Histology

Immunohistochemistry

Mice aged P30 and P180 were anesthetized with pentobarbital (150 mg/kg) and intracardially perfused with PBS followed by 4% buffered formaldehyde (Histofix, Roti). The brains were removed and fixed overnight in 4% Histofix. 40 μm sagittal sections were cut using a vibratome (VT1000S, Leica). Free-floating sections were permeabilized and blocked in 0.2% Triton-PBS, 3% BSA-PBS for 60 min before incubation with the first antibody in 0.2% Triton, 3% BSA-PBS overnight at 4°C. After three washes in PBS, sections were incubated with the secondary antibody in PBS for 2h, washed again in PBS, and mounted using Fluoromount G (Invitrogen). Primary antibodies were: rat anti-HA (1:300, Sigma), rabbit anti-Parvalbumin (PV27, 1:1000, Swant), mouse anti-Glutamate Decarboxylase 67 (GAD67, clone 1G10.2, 1:500, Millipore-Merk). Secondary antibodies were: goat anti-rat Alexa Fluor 488 (1:400, Invitrogen), donkey anti-rabbit Cy3 (1:1000, Jackson Immuno Research), goat anti-mouse Alexa Fluor 647 (1:1000, Jackson Immuno Research). Hoechst 33342 was used for nuclear staining. Images were acquired using a confocal microscope (SP5, Leica).

PV cell number and distribution

The distribution of PV neurons in different PFC layers was quantified using maximal intensity projections of 3D confocal stacks. For each mouse, 4 PFC sagittal sections were imaged using a confocal microscope (Leica SP5, 40X objective). Layers were identified based on Hoechst nuclear staining and delineated using ImageJ's ROI manager software. The distribution of PV neurons in different PFC layers was quantified using maximal intensity projections of 3D confocal stacks. The density of PV cells (number of PV cells per surface unit) in each layer was obtained by averaging the density across the 4 slices. During image

acquisitions and quantifications, the investigator was blind to the condition (control or C4-OE).

GAD67 expression

GAD67 expression levels in PV cells were measured by analyzing confocal images (Leica SP5, 40X objective) using ImageJ. For each animal, 3 to 4 PFC sagittal slices were acquired. At least 80 PV neurons per mouse were analyzed. A single confocal section located 10 μm below the surface of the slice was acquired in each slice. The same acquisition parameters were used for each slice and were set such that the brightness of the GAD67 immunostaining was below saturation values. The brightness of the PV immunostaining was set above saturation level, allowing to use PV as a marker to delineate the shape of PV neurons. The density of GAD67 immunostaining within PV cells was then automatically calculated using Image J. Several experiments were performed with a minimum of 6 mice per condition. As the fluorescence intensity is only comparable for samples processed simultaneously, the results are presented as a percentage of the mouse controls performed at the same time. During image acquisitions and quantifications, the investigator was blind to the condition (control or C4-OE).

Acute slice preparation

250 μm -thick coronal slices were prepared from brains of control and C4-OE mice. Mice were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (150 mg/kg) and perfused transcardially with ice-cold (0–4°C) oxygenated (95% O₂-5% CO₂) solution containing (in mM): 110 Choline chloride, 2.5 KCl, 25 glucose, 25 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 0.5 CaCl₂, 7 MgCl₂, 11.6 L-ascorbic acid and 3.1 sodium pyruvate. The brain was extracted and acute sagittal slices were cut in the same ice-cold solution using a vibroslicer (HM 650 V, Microm), then stored in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing the following (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 25 glucose, 25 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, and 1 MgCl₂, continuously bubbled with 95% O₂-5% CO₂. Slices were incubated in ACSF at 32°C for 20 minutes and then at room temperature (20-25°C). For patch-clamp recordings, slices were transferred to the recording chamber where they were continuously superfused with ACSF (30-32°C) buffered by continuous bubbling with 95% O₂-5% CO₂.

Electrophysiology and optogenetics

Whole-cell current and voltage-clamp recordings were performed in PFC layer II/III. Recorded pyramidal cells all expressed tdTomato. Recorded PV interneurons were in the vicinity of electroporated tdTomato+ pyramidal cells and were visually identified based on the expression of EGFP (in PV-Cre::RCE mice) or YFP (in PV-Cre::lox-STOP-lox ChR2-YFP mice). Stimulus delivery and data acquisition were performed using Patchmaster software (Multichannel Systems). Signals were acquired with an EPC10-usb amplifier (Multichannel Systems), sampled at 20 kHz and filtered at 4 kHz. Offline analysis was performed using Clampfit (Molecular Devices) and Igor Pro (Wavemetrics). For the study of miniature post synaptic currents, recordings were filtered offline at 2 kHz and analyzed using MiniAnalysis (Synaptosoft).

Patch-clamp pipettes (3–6 Mohm resistance) were prepared from borosilicate glass (BF150-86-10; Harvard Apparatus) using a DMZ pipette puller (Zeitz). Current-clamp experiments were performed using the following intracellular solution (in mM): 105 K-gluconate, 10 HEPES, 10 phosphocreatine-Na, 0.3 Na₃GTP, 4 MgATP, 30 KCl (pH 7.25, adjusted with KOH). For voltage-clamp experiments the following intracellular solution was used (in mM): 120 Cs-methane sulfonate, 10 CsCl, 10 Hepes, 10 Phosphocreatine, 0.2 EGTA, 8 NaCl, 2 ATP-Mg, 3 QX 314 (pH 7.25, adjusted with CsOH). To record miniature and evoked inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs and eIPSCs), we used an intracellular solution containing (in mM): 60 Cs methane sulfonate, 70 CsCl, 10 Hepes, 10 Phosphocreatine, 0.2 EGTA, 8 NaCl, 2 ATP-Mg (pH 7.25, adjusted with CsOH). Liquid junction potentials (-14.9 mV for Cs-based intracellular solutions and -5mV for the K⁺-based intracellular solution) were left uncorrected. The cell membrane resistance, membrane capacitance and series resistance were calculated in the seal-test configuration from the decay and steady-state of a current generated in response to a 10 mV hyperpolarizing voltage step. The series resistance was left uncompensated.

Excitability

Pyramidal cell and PV interneuron intrinsic properties and excitability were recorded in current-clamp in presence of the following synaptic blockers: SR95531 hydrobromide (Gabazine, 10 μ M, Hello Bio), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, 10 μ M, Hello Bio) and D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-APV, 50 μ M, Hello Bio). Spike frequency-depolarization curves were generated by injecting series of 500 ms depolarizing current steps increasing by 50 pA. The firing pattern of patched-clamped YFP⁺ cells in the

cortex of PV-Cre::lox-STOP-lox Chr2-YFP mice was monitored using 500 ms pulse of blue light emitted by a light emitting diode (CoolLED).

Miniature EPSCs and evoked EPSCs

Miniature excitatory post synaptic currents (mEPSCs) were recorded at a holding potential of -65 mV in the presence of tetrodotoxin (TTX, 0.5 μ M, Hello Bio) and Gabazine (10 μ M). At least 100s were analysed for each recording. Evoked excitatory post synaptic currents (eEPSCs) were recorded at a holding potential of -65 mV and triggered at a frequency of 0.1 Hz in the presence of GABAzine (10 μ M) with a monopolar electrode connected to a constant current stimulator (Iso-Flex, A.M.P.I.), positioned in the vicinity of the recorded neuron. At least 12 consecutive sweeps were acquired for each cell. The paired-pulse ratio (PPR) was calculated as the ratio of the peak amplitude of the averaged current response evoked by the second stimulation to the peak amplitude of the averaged current response evoked by the first stimulation.

Miniature IPSCs and evoked IPSCs

mIPSCs were recorded at a holding potential of -65 mV in the presence of TTX (0.5 μ M, Hello Bio), CNQX, (10 μ M) and D-APV (50 μ M). At least 100 s were analysed for each recording. Evoked IPSCs were recorded at a holding potential of +10mV to avoid unclamped action potentials commonly associated with evoked IPSCs measured at hyperpolarized potentials in our high-chloride recording conditions, in the presence of CNQX (10 μ M) and APV (50 μ M). At least 25 consecutive sweeps were acquired and averaged for each cell. For electrically evoked IPSC (eIPSCs), four stimulations at 20 Hz were applied with a monopolar electrode connected to a constant current stimulator positioned in layer 3, 100-150 μ m away from of the recorded neuron. For light-evoked IPSCs, the recorded pyramidal cell was placed in the center of the field of view. The response to four 0.5-ms pulses of blue light (470nm) at 20 Hz emitted by a light emitting diode (CoolLED) was recorded. The paired-pulse ratio of eIPSCs was calculated as the ratio of the peak amplitude of the averaged current response evoked by the second, third and fourth stimulations to the peak amplitude of the averaged current response evoked by the first stimulation.

AMPA/NMDA ratio and rectification index of AMPAR-mediated currents

To measure the AMPA/NMDA ratio and the rectification index, EPSC were evoked with a monopolar electrode positioned in layer 3, 100-150 μ m away from the recorded neuron. At

least 12 consecutive sweeps were acquired and averaged at each holding potential. The AMPA/NMDA ratio was recorded in presence of GABA_Azine (10 μ M). The AMPA current (I_{AMPA}) was measured as the peak amplitude of the current response at a holding potential of -65mV. The NMDA current (I_{NMDA}) was measured at a holding potential of +55mV, 50ms after stimulation, when AMPAR-mediated current have receded due to the fast deactivation kinetics of AMPARs. The ratio is calculated as $I_{\text{AMPA}}/I_{\text{NMDA}}$.

To study the rectification AMPA-mediated currents, pyramidal cells were recorded in the presence of GABA_Azine (10 μ M) and D-APV (50 μ M). Spermine (10 μ M) was added to the intracellular solution. The rectification index was defined as the peak amplitude of synaptic currents measured at a holding potential of +55 mV (\approx +40 mV after correcting for junction potential) multiplied by 2 and divided by the peak amplitude of synaptic currents measured at a holding potential of -65mV (\approx -80 mV after correcting for junction potential).

Behavior

Actimeter

We used actimeter racks of 8 circular corridors (Imetronic, <http://www.imetronic.com/devices/circular-corridor/>) equipped with infrared sensors to detect and automatically record locomotion. Animals were introduced individually in corridors and their spontaneous, novelty-driven activity was recorded for a total of 60 minutes. Activity, measured as photocell beam breaks, was averaged over periods of 5 minutes. Control and C4-OE male mice were tested at weaning (age P30).

Open Field

The test took place in a white open-field apparatus (ViewPoint, Lyon, France) under high illumination (\sim 100 lux). Animal were individually placed in the corner of the open-field and were allowed to explore for 9 min. A video tracking system, which included a computer-linked overhead camera, was used to monitor general locomotor activity (<https://viewpoint.fr/en/p/software/videotrack>, ViewPoint, Lyon, France). Control and C4-OE male mice were tested a week after weaning (age P35 – P39).

Odor Span and Spatial Span Test

Working memory capacity was tested using a protocol adapted from a previous study⁷. All scented mixtures were prepared with 100 g of sawdust, 18 ground powdered pellets

(Chocapic, Nestle) to mask the scent of the reward pellet and 3 g of a ground powder odor (Savory, Cinnamon, Cumin, Nutmeg, Mint, Fennel, Four spices, Herbs of Provence, Coriander, Basil, Coffee, Ginger). During shaping and testing, adult (4- to 6-month-old) male mice were maintained at 80-85% of their body weight. During the shaping phase, mice were trained to dig into a bowl of unscented sawdust to retrieve the hidden reward pellet. Once all animals had learned the procedure, the non-matching to sample (NMTS) task started for 5 consecutive days. Each day, the mouse was placed on a square platform and required to dig into the first bowl (odor 1) to retrieve the reward and to remember the scent of that bowl. Upon consumption of the reward pellet, a second baited bowl (odor 2) was added. The first bowl (no longer baited) and the new bowl were randomly distributed on the platform. Following retrieval of the pellet, the first bowl was removed and a novel baited bowl (odor 3) randomly placed. This process was repeated until each individual mouse had been exposed to 11 pairs of scented bowls or stopped after a maximum of 12 minutes when the mouse did not perform the task, and the number of correct pairs (direct digging into the baited bowl) was recorded. The order of the odors was randomized across days.

Following the NMTS, animals were then tested 4 consecutive days for the odor span task, using the same procedure except that, following reward retrieval, the no longer baited bowls were not removed so that mice had to remember an increasing numbers of odors (span). The span length was calculated as the number of correct responses with more than one bowl on the platform prior to the first mistake. Thus, using 12 odors, the maximum span length is 11. The span score was given by the first mistake, but each mouse was allowed to continue the task until the 12 odors had been sampled or for a maximum of 12 minutes. The span length was the best score obtained by each tested mouse over a period of 4 consecutive days. As for the NMTS task, the order of the odors was randomized across days.

The same mice were subsequently tested for 4 consecutive days in the spatial span task. They had to remember an increasing numbers of locations, following a procedure similar to the odor span test, except that bowls of unscented sawdust were identified according to their spatial location on the platform. The span length was the best score obtained by each tested mouse over a period of 4 consecutive days.

The investigator was blind to the condition (control or C4-OE) during behavioral tests and analysis.

Immunoblotting

Mice were euthanized under anesthesia and brains were removed from the skull. TdTomato-expressing areas of the prefrontal cortex were dissected under a stereomicroscope. Extracts were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 µl/ml NP-40, 5 µg/ml sodium deoxycholate, 1 µg/ml SDS) containing Complete protease inhibitors (Roche). 10 brain extracts in each condition were pooled and equal amounts of proteins (60µg) were loaded on NuPAGE 8–12% Bis-Tris gels (Thermo Fisher Scientific) and transferred to 0.45 µm nitrocellulose membrane in 25 mM Tris–HCl, pH 7.4, 192 mM glycine and 200 ml/l ethanol for 2h at 4°C. Membranes were blocked with 50 g/l non-fat dry milk in Tris-buffered saline (TBS; 0.25 M Tris/0.5 M NaCl, pH 7.5) for 1 h at room temperature and then incubated with primary antibodies in the same buffer containing Tween 0.1% (TBST) for at least 2h. After three washes in TBST, the membranes were incubated for 1h with IRDye-conjugated secondary antibodies, and imaged using Odyssey Imaging System (LI-COR Biosciences). Quantifications were performed using Image Studio Lite software (LI-COR Biosciences). C4 levels were quantified by normalizing to the loading control, GAPDH. Primary antibodies were: rat anti-HA (1:500, Sigma), rabbit anti-C4α (1:2000, Proteintech), chicken anti-GAPDH (1:2000, Millipore). Secondary antibody were: goat anti-rat IR800 (1:10000, Advansta), goat anti-rabbit IR700 (1:10000, Invitrogen) and goat anti-chicken IR700 (1:10000, Advansta).

Statistical analysis

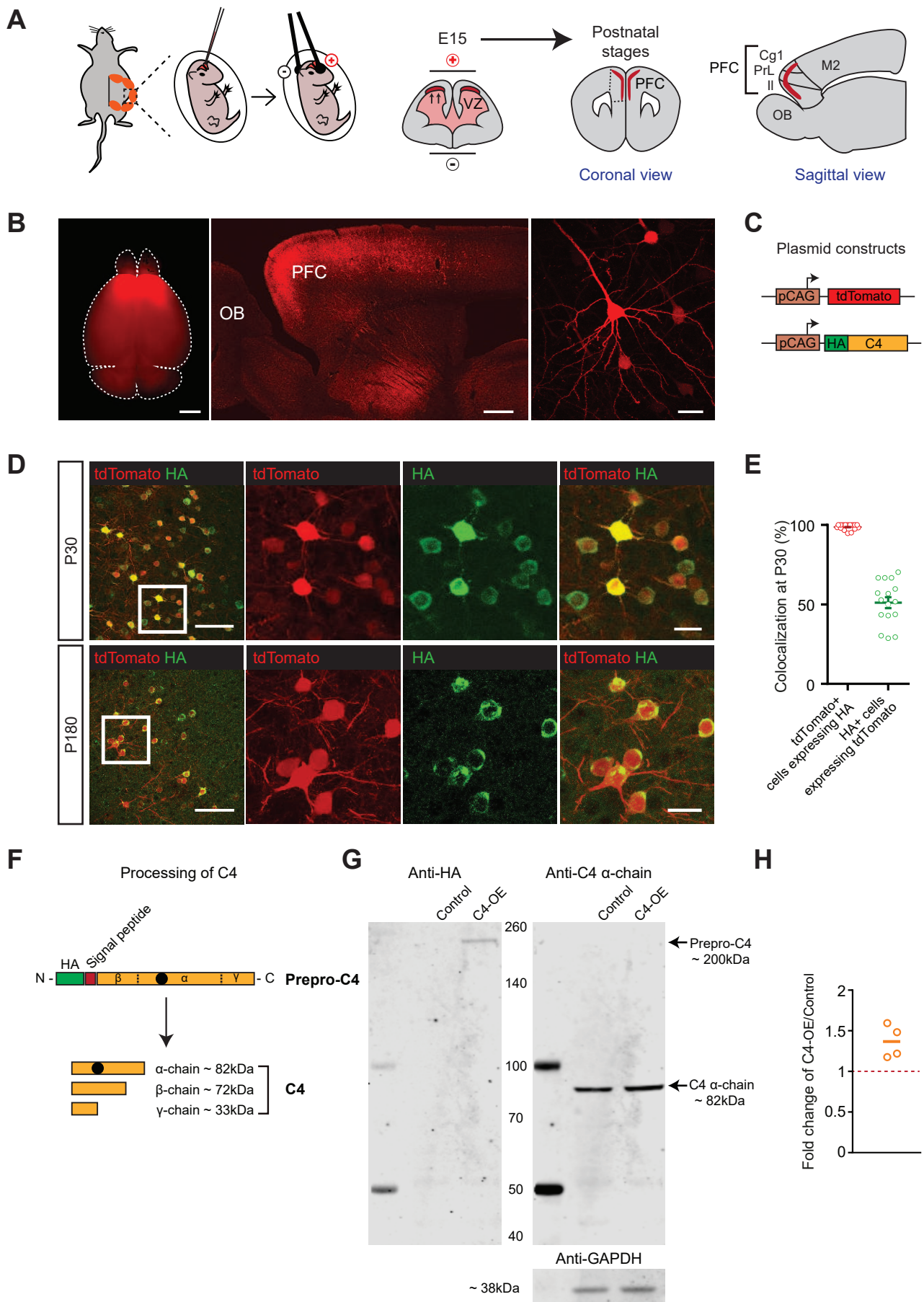
Data are presented as mean ± SEM. Statistical analyses were performed using Prism (Graphpad). The normality of data distribution was tested using Shapiro-Wilk's test. Unpaired two-tailed T-tests (for normally distributed datasets) or Mann–Whitney tests (for non-normally distributed datasets) were used for comparisons between two groups. For multiple comparisons we used two-way ANOVA followed by Sidak's test. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant. P values are reported as follows: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

Supplementary references

1. Matsuda T, Cepko CL. Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**(1): 16-22.
2. Bittner T, Fuhrmann M, Burgold S, Ochs SM, Hoffmann N, Mitteregger G *et al.* Multiple events lead to dendritic spine loss in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *PLoS One* 2010; **5**(11): e15477.

3. Fuhrmann M, Bittner T, Jung CK, Burgold S, Page RM, Mitteregger G *et al.* Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 2010; **13**(4): 411-413.
4. Fuhrmann M, Mitteregger G, Kretzschmar H, Herms J. Dendritic pathology in prion disease starts at the synaptic spine. *J Neurosci* 2007; **27**(23): 6224-6233.
5. Gu L, Kleiber S, Schmid L, Nebeling F, Chamoun M, Steffen J *et al.* Long-term in vivo imaging of dendritic spines in the hippocampus reveals structural plasticity. *J Neurosci* 2014; **34**(42): 13948-13953.
6. Pfeiffer T, Poll S, Bancelin S, Angibaud J, Inavalli VK, Keppler K *et al.* Chronic 2P-STED imaging reveals high turnover of dendritic spines in the hippocampus in vivo. *eLife* 2018; **7**.
7. Young JW, Kerr LE, Kelly JS, Marston HM, Spratt C, Finlayson K *et al.* The odour span task: a novel paradigm for assessing working memory in mice. *Neuropharmacology* 2007; **52**(2): 634-645.
8. Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Salway P, Busby SJ. Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol* 2005; **492**(2): 145-177.
9. Schwab M, Agid Y, Glowinski J, Thoenen H. Retrograde axonal transport of 125I-tetanus toxin as a tool for tracing fiber connections in the central nervous system; connections of the rostral part of the rat neostriatum. *Brain Res* 1977; **126**(2): 211-224.
10. Arikuni T, Kubota K. The organization of prefrontocaudate projections and their laminar origin in the macaque monkey: a retrograde study using HRP-gel. *J Comp Neurol* 1986; **244**(4): 492-510.
11. Reiner A, Hart NM, Lei W, Deng Y. Corticostriatal projection neurons - dichotomous types and dichotomous functions. *Front Neuroanat* 2010; **4**: 142.

Supplementary figures, tables and legends



Supplementary Figure 1: C4 overexpression in prefrontal cortex using in utero electroporation

(A) Schematic drawing illustrating the in utero electroporation (IUE) method at embryonic day 15 (E15) for specific targeting of layer II/III PFC pyramidal neurons. Targeted PFC areas include the anterior cingulate cortex (CgI), the prelimbic cortex (PrL) and the infralimbic cortex (II). VZ: ventricular zone; OB: olfactory bulb.

(B) Left panel: Electroporated brain at postnatal day 30 (P30) exhibiting tdTomato expression in PFC; scale bar: 5 mm. Middle panel: Sagittal slice showing the distribution of TdTomato positive cells in PCF layer II/III. Note that the expression of tdTomato in the striatum originates from tdTom+ PFC neurons in layer II-III which are known to send direct axonal projections to the striatum in mammals⁸⁻¹¹. OB: olfactory bulb; scale bar: 500 μ m. Right panel: typical morphology of an electroporated pyramidal cell; scale bar: 30 μ m.

(C) Plasmid constructs used for IUE. Embryonic brains were co-electroporated with pCAG-HA-C4 and pCAG-tdTomato for C4 overexpression (C4-OE), or only with pCAG-tdTomato (control). pCAG-HA-C4 and pCAG-tdTomato were co-electroporated with a 4:1 ratio to ensure that most tdTomato+ cells overexpressed C4.

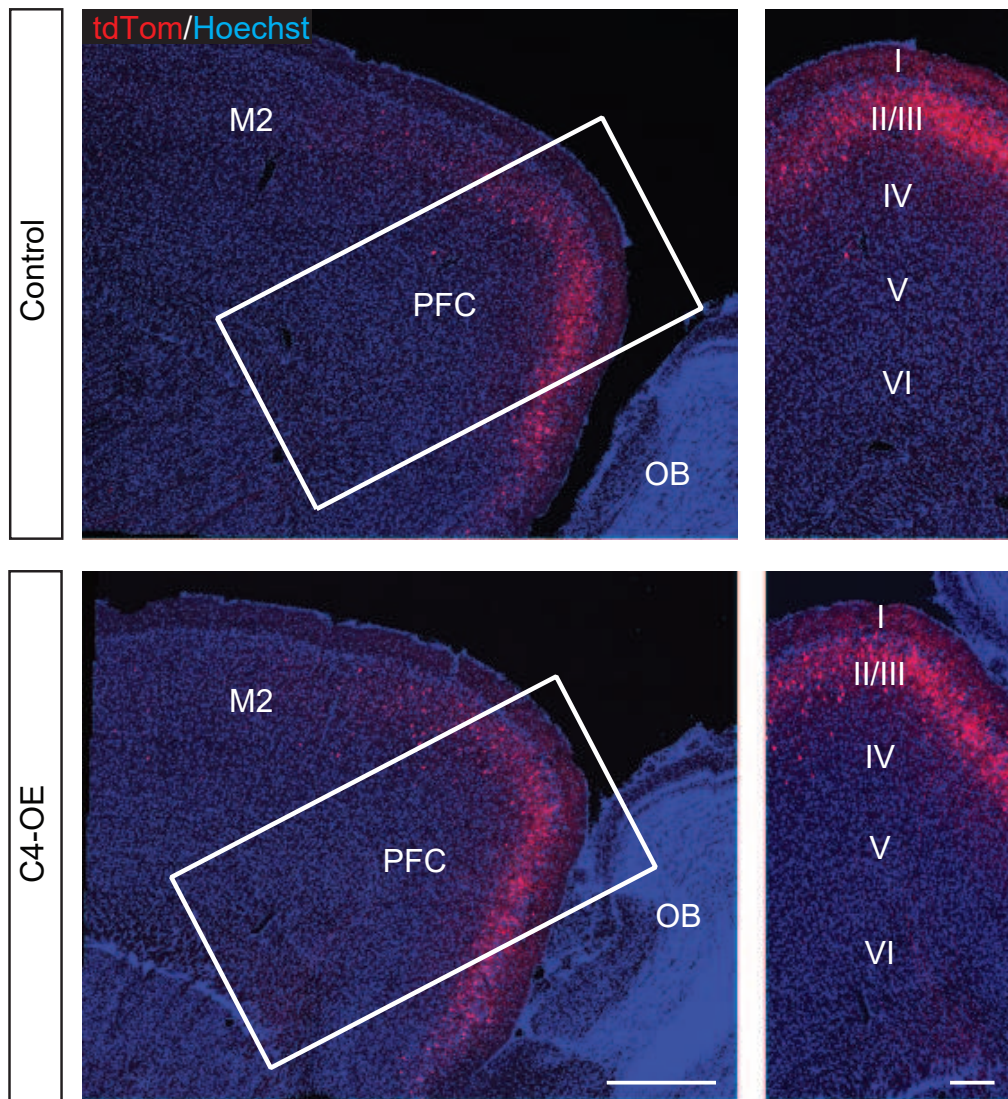
(D) Immunostaining for TdTomato (red) and HA (green) in PFC layer II/III at P30 (upper panels) and P180 (bottom panels). The three panels on the right are enlargements of the boxed area in the left panel. Note that tdTom+ neurons also expressed HA-C4; scale bar: 100 μ m; scale bar in magnified image: 20 μ m.

(E) Quantification of the results obtained from P30 mice as exemplified in (D).

(F) Schematic drawing illustrating the processing of C4: C4 is synthesized as a single chain precursor molecule (prepro-C4) and processed to a three-chain structure (β - α - γ) before secretion. The HA tag was added at the 5' end of the signal peptide-encoding sequence, i.e. before the signal peptide region, in order not to interfere with the folding and processing of C4. The black dot represents the antigenic region recognized by the anti-C4 α -chain antibody used for western blot experiments in (G).

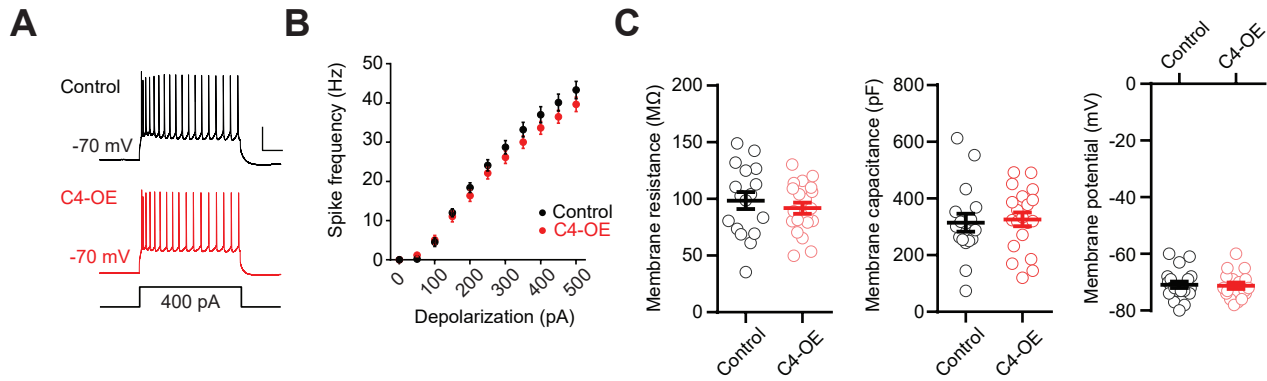
(G) Immunoblot of HA (left) and C4 α -chain (right) in lysates from the electroporated region of control and C4-OE mice aged P30. To compensate for the lack of material and relatively low levels of C4 expression, lysates from the electroporated region were prepared from individual mice and pooled for the western blot analysis (control mice: N = 10 ; C4-OE mice: N = 10). Left panel: HA was only detected at the molecular weight of prepro-C4 (~ 200 kDa) in the C4-OE condition, suggesting that the HA tag was correctly cleaved together with the signal peptide. Right panel: a band was detected at the molecular weight of the C4 α -chain (~ 82 kDa). Data were normalized to GAPDH.

(H) Densitometry quantification of the results illustrated in (G). Data were normalized to GAPDH for each experiment and expressed as a fold change of control mean density. The experiment was repeated four times. Each circle represents the result of an individual experiment. The bar represents the mean of four experiments.



Supplementary Figure 2: Similar laminar position of electroporated pyramidal cells in control and C4-OE mice

Left: sagittal PFC sections from control and C4-OE mice; scale bar: 300 μ m. Right, enlargements of the boxed area in the left panel showing PFC layers. All tdTomato+ cells are located in PFC layer III; scale bar: 100 μ m; M2: motor cortex; PFC: prefrontal cortex; OB: olfactory bulb.



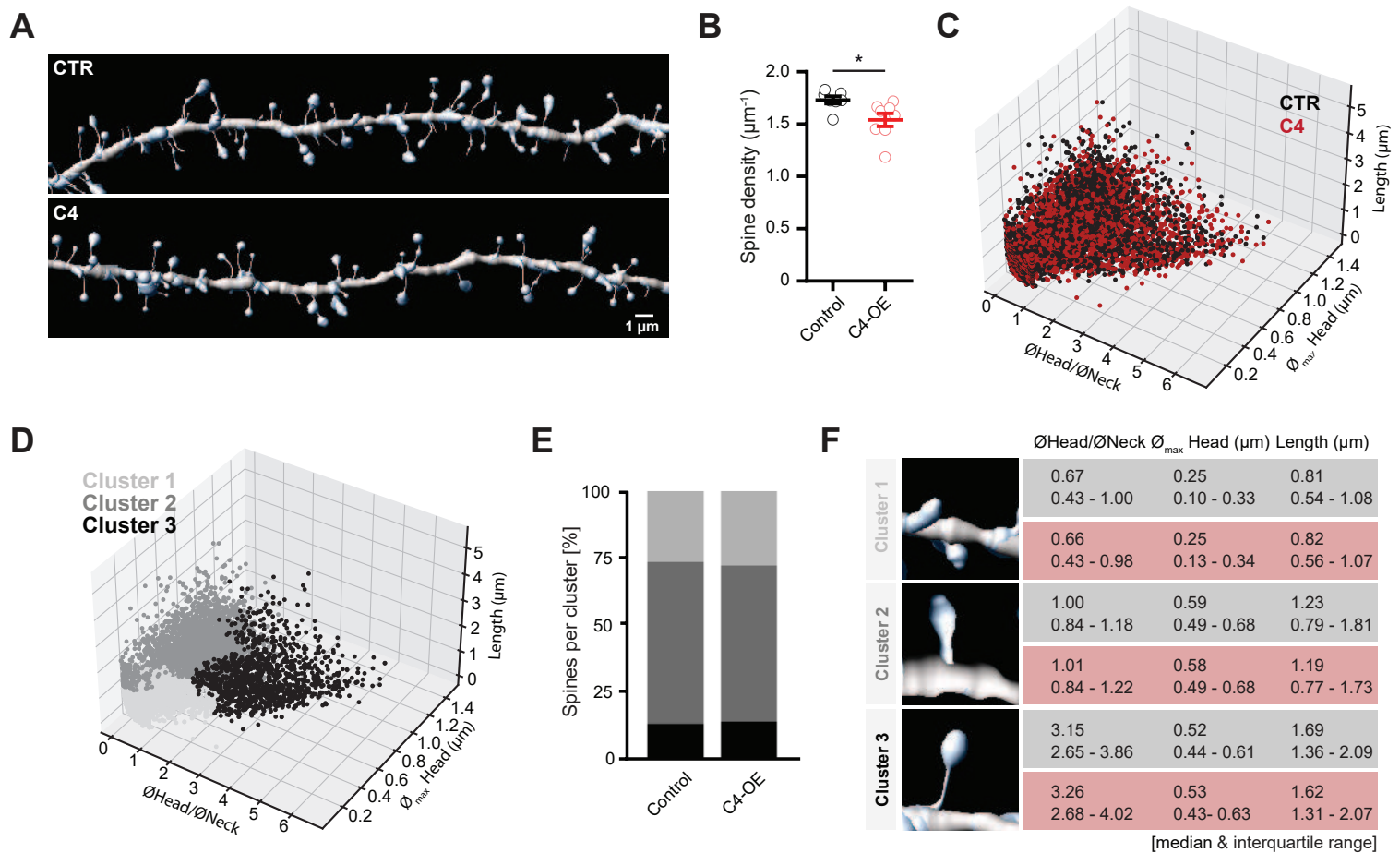
Supplementary Figure 3: Passive and active neuronal properties in control and C4-OE mice

(A) Sample spike trains evoked by a 400 pA somatic current injection in a control and in a C4-OE pyramidal cell; scale bars: 20 mV/100 ms.

(B) f-i curves for control (n = 20 cells from 3 mice) and C4-OE neurons (n = 17 cells from 3 mice).

(C) Input resistance (left), Cell capacitance (middle) and resting membrane potential (right) in control (n = 20 cells from 3 mice) and C4-OE neurons (n = 17 cells from 3 mice). Neither firing frequency nor intrinsic neuronal properties differed between control and C4-OE pyramidal cells.

All data are represented as mean \pm SEM. Each open circle represents an individual neuron.



Supplementary Figure 4: Cluster analysis of dendritic spines in control and C4-OE mice

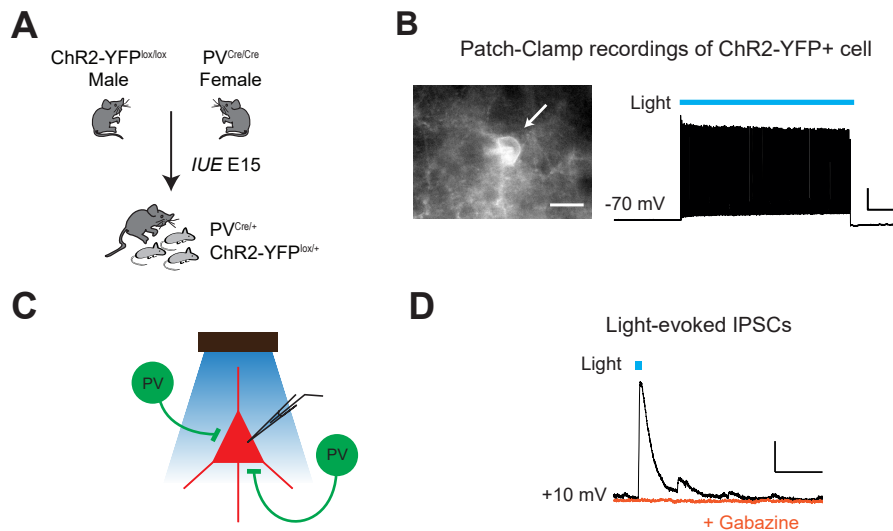
(A) 3D reconstruction of dendritic fragments confocally imaged in fixed tissue of control (CTR) and C4-OE animals aged P15-P18.

(B) Spine density measured on reconstructed dendrites; data from $n = 7$ CTR and $n=8$ C4-OE mice with in total 49 (CTR) and 66 (C4-OE) dendrites; single dots show individual mice; diagram shows mean \pm SEM; $p=0.0229$, unpaired t-test; statistics were performed using individual mice as the unit of analysis.

(C, D) 3D morphology plots visualizing the spines of CTR and C4-OE mice (C), and their affiliation to identified clusters 1, 2 and 3 (D); plotted are, the ratio of mean head to neck diameters ($\emptyset_{\text{Head}}/\emptyset_{\text{Neck}}$), spine length and maximum head diameter ($\emptyset_{\text{max Head}}$) of in total 8123 (CTR) and 10946 spines (C4-OE).

(E) Quantification of spine proportions within identified clusters, comparing spines of CTR and C4-OE mice.

(F) Table summarizing the morphological parameters utilized for the cluster analysis: $\emptyset_{\text{Head}}/\emptyset_{\text{Neck}}$, $\emptyset_{\text{max Head}}$ and length of spines, for CTR (grey) and C4-OE animals (red). Data are represented as median and interquartile range (25th–75th percentile).



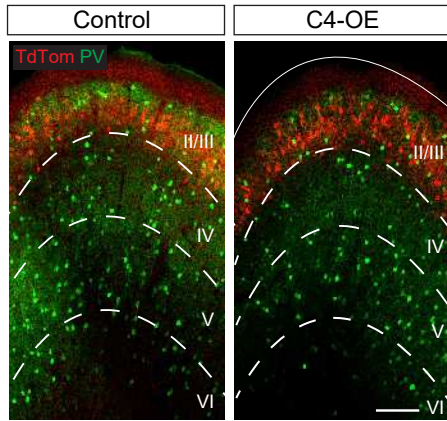
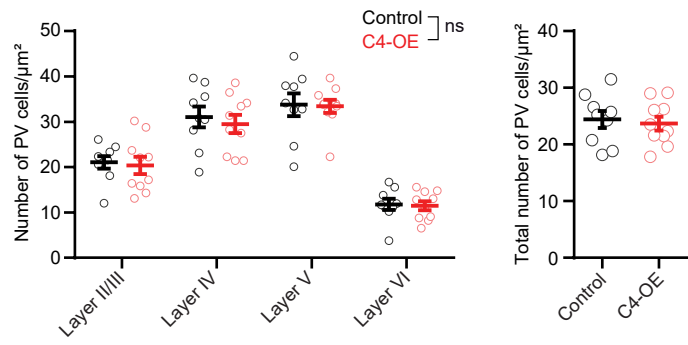
Supplementary Figure 5: Light-evoked firing of ChR2-expressing PV neurons

(A) Homozygous PV-Cre::RCE females were crossed with homozygous lox-STOP-lox ChR2-YFP males before electroporation of timed-pregnant females with tdTomato or C4 + tdTomato. Electroporated offspring (age P25-P30) were used for ex vivo patch-clamp and optogenetics.

(B) Left, patch-clamped YFP+ cell (arrow); right, spike train evoked by a 500 ms pulse of blue (470 nm) light. YFP+ cells exhibited the typical fast-spiking pattern of PV neurons ($n = 3$ neurons).

(C) Light-evoked IPSCs were recorded at a holding potential of +10 mV in electroporated PFC pyramidal cells from control or C4-OE PVCre-RCE::lox-STOP-lox ChR2-YFP mice.

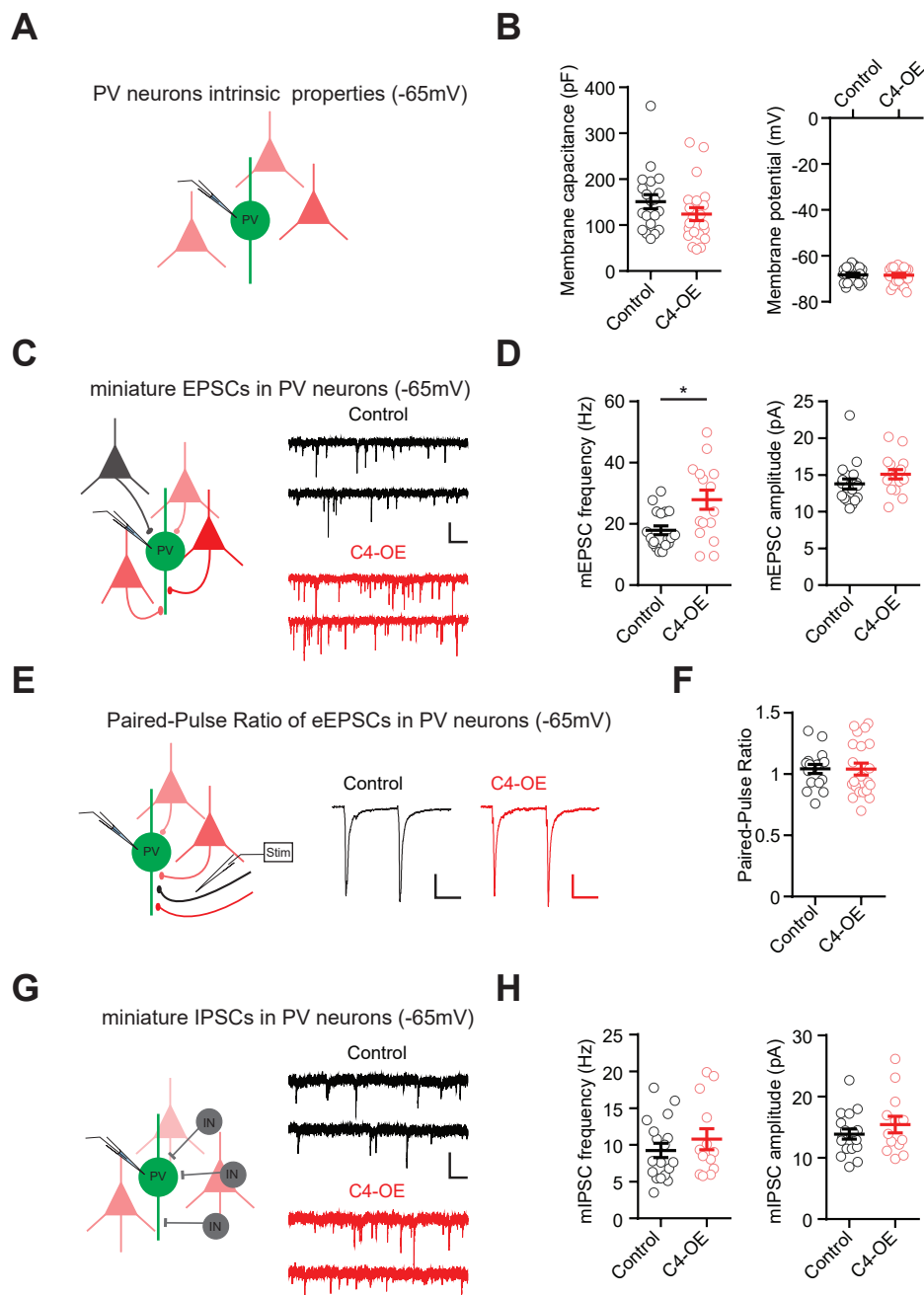
(D) Light-evoked IPSC blocked by the addition of Gabazine (10 μ M), demonstrating its GABAergic nature; scale bars: 50 pA/50ms.

A**B**

Supplementary Figure 6: Laminar distribution of PV neurons in control and C4-OE mice

(A) PV staining in PFC sagittal slices from a control and from a C4-OE mouse; scale bar: 100 μ m.

(B) The repartition by layer (left) as well as the total number of histologically identified PV (right) was unchanged in C4-OE mice ($n = 10$ mice) compared to control mice ($n = 9$ mice) (Two-Way ANOVA, $P > 0.05$). All data are represented as mean \pm SEM. ns, not significant.



Supplementary Figure 7: Increased excitatory inputs onto PV neurons in C4-OE mice

(A) Sample traces of mEPSCs recordings in PV interneurons from control and C4-OE juvenile (P25-P30) mice recorded at -65 mV in the presence of TTX and GABazine; scale bars: 20 pA/100ms.

(B) mEPSC frequency, but not IPSC amplitude, was lower in C4-OE mice ($n = 16$ cells from 6 mice) than in control mice ($n = 20$ cells from 3 mice; frequency: Mann-Whitney test, * $P = 0.0184$).

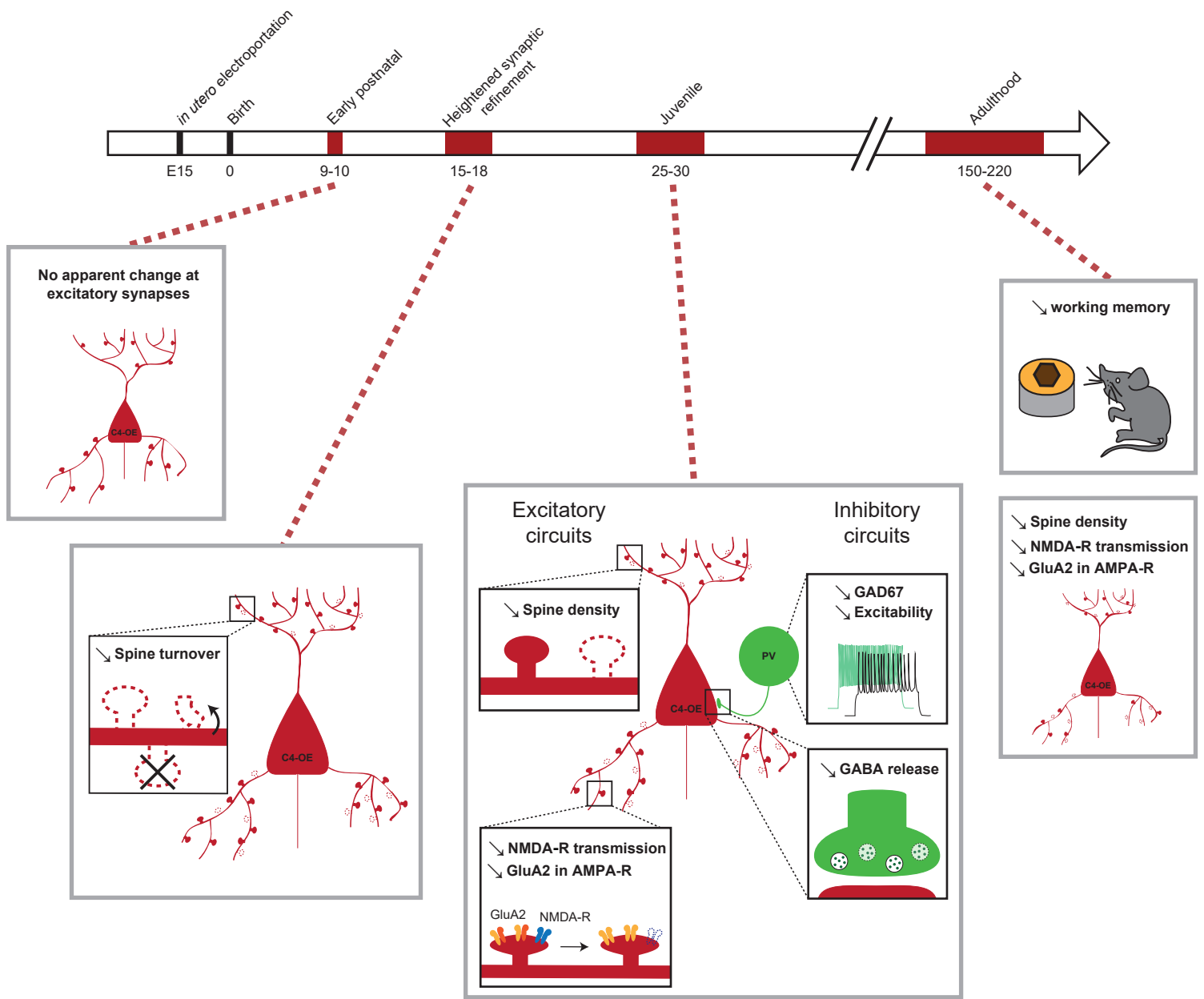
(C) Average of 12 consecutive recordings; EPSCs were evoked by paired-pulse stimulation and recorded in PV interneurons from control and C4-OE mice at a holding potential of -65 mV; scale bars: 50 pA/50 ms.

(D) Summary histogram of the paired-pulse ratio in control and C4-OE (control: $n = 24$ cells from 4 mice; C4-OE: $n = 21$ cells from 3 mice).

(E) Sample traces of mIPSCs recorded at a holding potential of -65 mV with a high-chloride intracellular solution in PV interneurons from control and C4-OE juvenile (P25-P30) mice, in the presence of TTX, APV and CNQX; scale bar: 20 pA/100 ms.

(F) Mean frequency (left) and amplitude (right) of mIPSCs in control ($n = 18$ cells from 4 mice) and C4-OE neurons ($n = 13$ cells from 4 mice).

All data are represented as mean \pm SEM. Open circles represent single cells.



Supplementary Figure 8: Overview diagram summarizing the main findings at different stages of postnatal development

Table S1

	Control	n	N	L	C4-OE	n	N	L	Test	p value	Significant	F statistics (ANOVA)	
Intrinsic properties at P25-P30													
Membrane resistance (MΩ)	91.9 ± 4.97	20	3	2	98.6 ± 7.62	17	3	3	T-test	0.456	ns		
Resting membrane potential (mV)	-70.9 ± 1.16	20	3	2	-71.2 ± 1.17	17	3	3	T-test	0.841	ns		
Membrane capacitance (pF)	327 ± 24.7	20	3	2	315 ± 31.6	17	3	3	T-test	0.773	ns		
Firing frequency		20	3	2		17	3	3	Two-way RM ANOVA	0.304	ns	F _(1,35) = 1.09	
mEPSC frequency (Hz)										Two-way ANOVA	C4 factor: <0.0001	****	F _(1,105) = 17.4
											Age factor: <0.0001	****	F _(2,105) = 54.4
											Interaction: 0.0059	**	F _(2,105) = 5.4
<i>P9-P10</i>	2.03 ± 0.17	21	3	2	2.02 ± 0.15	18	4	2	Sidak's post-hoc test		ns		
<i>P25-P30</i>	10.2 ± 1.31	16	5	4	6.20 ± 0.90	14	6	3	Sidak's post-hoc test		#####		
<i>P150-P220</i>	4.58 ± 0.36	20	6	4	2.59 ± 0.21	22	5	4	Sidak's post-hoc test		#		
<i>Control: P9-P10 vs P25-P30</i>									Sidak's post-hoc test		#####		
<i>Control: P25-P30 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		#####		
<i>Control: P9-P10 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		##		
<i>C4-OE: P9-P10 vs P25-P30</i>									Sidak's post-hoc test		#####		
<i>C4-OE: P25-P30 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		###		
<i>C4-OE: P9-P10 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		ns		
mEPSC amplitude (pA)										Two-way ANOVA	C4 factor: 0.399	ns	F _(1,105) = 0.716
											Age factor: <0.0001	****	F _(2,105) = 85.82
											Interaction: 0.477	ns	F _(2,105) = 0.745
<i>P9-P10</i>	17.2 ± 1.241	21	3	2	17.7 ± 0.855	18	4	2	Sidak's post-hoc test		ns		
<i>P25-P30</i>	8.87 ± 0.586	16	5	4	8.10 ± 0.478	14	6	3	Sidak's post-hoc test		ns		
<i>P150-P220</i>	9.927 ± 0.442	20	6	4	8.637 ± 0.350	22	5	4	Sidak's post-hoc test		ns		
<i>Control: P9-P10 vs P25-P30</i>									Sidak's post-hoc test		#####		
<i>Control: P25-P30 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		ns		
<i>Control: P9-P10 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		#####		
<i>C4-OE: P9-P10 vs P25-P30</i>									Sidak's post-hoc test		#####		
<i>C4-OE: P25-P30 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		ns		
<i>C4-OE: P9-P10 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		#####		
Excitatory PPR										Two-way ANOVA	C4 factor: 0.809	ns	F _(1,105) = 0.033
											Age factor: 0.0011	**	F _(1,105) = 7.31
											Interaction: 0.806	ns	F _(1,105) = 0.213
<i>P9-P10</i>	0.916 ± 0.056	16	3	2	0.875 ± 0.031	21	3	2	Sidak's post-hoc test		ns		
<i>P25-P30</i>	1.04 ± 0.04	17	3	2	1.04 ± 0.05	21	3	2	Sidak's post-hoc test		ns		

<i>P150-P220</i>	1.06 ± 0.07	19	5	3	1.08 ± 0.04	17	4	3	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Control: P9-P10 vs P25-P30</i>									Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Control: P25-P30 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Control: P9-P10 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		ns	
<i>C4-OE: P9-P10 vs P25-P30</i>									Sidak's post-hoc test		ns	
<i>C4-OE: P25-P30 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		ns	
<i>C4-OE: P9-P10 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		#	
AMPA/NMDA ratio									Two-way ANOVA	C4 factor: <0.0001	****	F (1, 108) = 18.9
										Age factor: <0.0001	****	F (2, 108) = 40.6
										Interaction: 0.007	**	F (1, 108) = 5.2
<i>P9-P10</i>	0.856 ± 0.078	17	3	2	0.844 ± 0.085	21	3	2	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>P25-P30</i>	0.928 ± 0.028	23	4	2	1.294 ± 0.086	20	5	3	Sidak's post-hoc test		###	
<i>P150-P220</i>	1.317 ± 0.073	17	4	2	1.752 ± 0.085	16	4	3	Sidak's post-hoc test		###	
<i>Control: P9-P10 vs P25-P30</i>									Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Control: P25-P30 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		###	
<i>Control: P9-P10 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		###	
<i>C4-OE: P9-P10 vs P25-P30</i>									Sidak's post-hoc test		####	
<i>C4-OE: P25-P30 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		###	
<i>C4-OE: P9-P10 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		####	
NMDA decay time (ms)									Two-way ANOVA	C4 factor: 0.490	ns	F (1, 108) = 0.48
										Age factor: <0.0001	****	F (2, 108) = 73.09
										Interaction: 0.332	ns	F (1, 108) = 1.12
<i>P9-P10</i>	0.098 ± 0.008	17	3	2	0.104 ± 0.006	21	3	2	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>P25-P30</i>	0.056 ± 0.003	23	4	2	0.051 ± 0.002	20	5	3	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>P150-P220</i>	0.058 ± 0.003	17	4	2	0.050 ± 0.002	16	4	3	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Control: P9-P10 vs P25-P30</i>									Sidak's post-hoc test		####	
<i>Control: P25-P30 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Control: P9-P10 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		####	
<i>C4-OE: P9-P10 vs P25-P30</i>									Sidak's post-hoc test		####	
<i>C4-OE: P25-P30 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		ns	
<i>C4-OE: P9-P10 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		####	
Rectification Index									Two-way ANOVA	C4 factor: <0.0001	****	F (1, 112) = 18.09
										Age factor: 0.0058	**	F (2, 112) = 5.40
										Interaction: 0.196	ns	F (2, 112) = 1.65
<i>P9-P10</i>	1.09 ± 0.06	20	3	2	1.02 ± 0.05	20	3	2	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>P25-P30</i>	1.31 ± 0.05	21	3	3	1.06 ± 0.05	16	3	2	Sidak's post-hoc test		##	

<i>P150-P220</i>	1.13 ± 0.03	17	4	2	0.97 ± 0.03	24	3	2	Sidak's post-hoc test		#	
<i>Control: P9-P10 vs P25-P30</i>									Sidak's post-hoc test		##	
<i>Control: P25-P30 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		#	
<i>Control: P9-P10 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		ns	
<i>C4-OE: P9-P10 vs P25-P30</i>									Sidak's post-hoc test		ns	
<i>C4-OE: P25-P30 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		ns	
<i>C4-OE: P9-P10 vs P150-P220</i>									Sidak's post-hoc test		ns	
mIPSC Amplitude at P25-P30 (pA)	17.1 ± 0.98	16	4	2	12.74 ± 0.46	16	6	4	T-test	0.0003	***	
mIPSC Frequency at P25-P30 (Hz)	7.08 ± 0.57	16	4	2	4.46 ± 0.61	16	6	4	Mann-Whitney test	0.0004	***	
Short-term plasticity of evoked IPSCs at P25-P30 (electrical stim)									Two-way RM ANOVA	0.089	ns	F _(1,64) = 2.988
<i>Pulse II/ pulse I</i>	0.542 ± 0.028	29	3	2	0.610 ± 0.027	37	3	2	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Pulse III/ pulse I</i>	0.437 ± 0.025	29	3	2	0.488 ± 0.024	37	3	2	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Pulse IV/ pulse I</i>	0.397 ± 0.022	29	3	2	0.442 ± 0.021	37	3	2	Sidak's post-hoc test		ns	
Short-term plasticity of evoked IPSCs at P25-P30 (optogenetics)									Two-way RM ANOVA	0.014	*	F _(1,71) = 6.85
<i>Pulse II/ pulse I</i>	0.541 ± 0.016	43	4	3	0.592 ± 0.021	30	3	2	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Pulse III/ pulse I</i>	0.400 ± 0.013	43	4	3	0.465 ± 0.019	30	3	2	Sidak's post-hoc test		#	
<i>Pulse IV/ pulse I</i>	0.357 ± 0.014	43	4	3	0.411 ± 0.018	30	3	2	Sidak's post-hoc test		ns	

Table S1. Summary table of patch-clamp results (pyramidal cells)

N refers to the number of mice, n refers to the number of neuronal recordings, L refers to the number of litters. All data are presented as mean ± SEM. Sidak's test # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$; ### $P < 0.001$; #### $P < 0.0001$.

Table S2

	Control	N	L	C4-OE	N	L	Test	p value	Significant	F statistics (ANOVA)
<i>In vivo</i> 2-photon imaging at P30										
Spine density	0.880 ± 0.043	10	3	0.666 ± 0.029	7	3	T-test	0.0023	**	
<i>In vivo</i> 2-photon imaging at P15-P18										
Spine density at 0h	1.145 ± 0.028	5	3	0.921 ± 0.021	7	3	Mann-Whitney test	0.0025	**	
Spine density from 0h to 4h		5	3		7	3	Two-way RM ANOVA	C4 factor: < 0.0001	****	F _(1,10) = 44.8
								Time factor: 0.780	ns	F _(1,10) = 0.083
								Interaction 0.366	ns	F _(1,10) = 0.899
Stable spine density	1.044 ± 0.024	5	3	0.883 ± 0.002	7	3	T-test	0.0007	***	
Gained spine density	0.092 ± 0.009	5	3	0.045 ± 0.007	7	3	T-test	0.0018	**	
Lost spine density	0.099 ± 0.006	5	3	0.039 ± 0.006	7	3	T-test	< 0.0001	****	
Turnover rate (%)	8.767 ± 0.545	5	3	5.091 ± 0.728	7	3	T-test	0.0039	**	
Fixed tissue at P15-P18										
Spine density	1.731 ± 0.035	7	3	1.541 ± 0.061	8	3	T-test	0.023	*	
GAD 67 expression										
Mean intensity (% control group)	100 ± 3.36	28	9	86.62 ± 3.59	33	10	T-test	0.0094	**	
PV cell distribution		9	3		10	3	Two-way ANOVA	0.563	ns	F _(1,68) = 0.338
<i>Layer II/III</i>	21.1 ± 1.4	9	3	20.4 ± 1.9	10	3	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Layer IV</i>	31.1 ± 2.3	9	3	29.5 ± 2.0	10	3	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Layer V</i>	33.8 ± 2.5	9	3	33.4 ± 1.5	10	3	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Layer VI</i>	11.8 ± 1.2	9	3	11.5 ± 1.0	10	3	Sidak's post-hoc test		ns	
PV cell total number	24.4 ± 1.5	9	3	23.7 ± 1.21	10	3	T-test	0.705	ns	

Table S2. Summary table of imaging results

N refers to the number of mice, L refers to the number of litters. All data are presented as mean ± SEM.

Table S3

	Control	n	N	L	C4-OE	n	N	L	Test	p value	Significant	F statistics (ANOVA)
Intrinsic properties												
Membrane resistance (M Ω)	129.4 \pm 8.8	20	3	2	98.3 \pm 7.0	21	4	2	Mann-Whitney test	0.0024	**	
Resting membrane potential (mV)	-68.0 \pm 0.8	20	3	2	-68.6 \pm 0.8	21	4	2	T-test	0.881	ns	
Membrane capacitance (pF)	151 \pm 15	20	3	2	124 \pm 14	21	4	2	Mann-Whitney test	0.127	ns	
Firing		20	3	2		21	4	2	Two-way ANOVA	C4 factor: 0.0129	*	F _(1,37) = 6.82
										Depolarization: <0.0001	****	F _(10,370) = 371.8
										Interaction: <0.0001	****	F _(10,370) = 4.17
mEPSC Amplitude (pA)	13.8 \pm 0.7	18	5	3	15.1 \pm 0.6	16	6	3	Mann-Whitney test	0.069	ns	
mEPSC Frequency (Hz)	17.9 \pm 1.4	18	5	3	27.9 \pm 3.1	16	6	3	Mann-Whitney test	0.018	*	
Excitatory PPR	1.04 \pm 0.06	24	4	2	1.12 \pm 0.05	21	3	2	T-test	0.251	ns	
mIPSC Amplitude (pA)	13.9 \pm 0.8	18	4	2	15.4 \pm 1.4	13	4	3	T-test	0.312	ns	
mIPSC Frequency (Hz)	9.25 \pm 0.97	18	4	2	10.8 \pm 1.43	13	4	3	T-test	0.365	ns	

Table S3. Summary table of patch-clamp results (PV interneurons)

N refers to the number of mice, n refers to the number of neuronal recordings, L refers to the number of litters. All data are presented as mean \pm SEM.

Table S4

	Control	N	L	C4-OE	N	L	Test	p value	Significant	F statistics (ANOVA)
Locomotion										
Actimeter (repeated measures)		32	12		21	9	Two-way RM ANOVA	C4 factor: 0.765	ns	$F_{(1,51)} = 0.09$
								Time factor: < 0.0001	****	$F_{(11,561)} = 31.82$
								Interaction 0.366	ns	$F_{(11,561)} = 0.584$
Actimeter total activity	384 ± 21	32	12	396 ± 38	21	9	Mann-Whitney test	0.531	ns	
Open field (repeated measures)		20	10		14	8	Two-way RM ANOVA	C4 factor: 0.127	ns	$F_{(1,32)} = 2.458$
								Time factor: < 0.0001	****	$F_{(8,256)} = 4.250$
								Interaction 0.0037	**	$F_{(8,256)} = 2.975$
Open field total activity	2242 ± 121	20	10	1950 ± 140	14	8	Mann-Whitney test	0.189	ns	
Working memory										
Non-matching to sample		15	5		14	6	Two-way RM ANOVA	C4 factor: 0.556	ns	$F_{(1,135)} = 0.348$
								Time factor: < 0.0001	****	$F_{(1,135)} = 51.80$
								Interaction 0.364	ns	$F_{(4,135)} = 0.364$
Odor Span	8.40 ± 0.83	15	5	4.43 ± 0.54	14	6	Mann-Whitney test	0.0022	**	
Spatial Span	6.40 ± 0.73	15	4	4.21 ± 0.68	14	6	Mann-Whitney test	0.045	*	

Table S4. Summary table of behavioral studies

N refers to the number of mice, L refers to the number of litters. All data are presented as mean ± SEM.

Article B. Les interactions et le regroupement des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{2B} régulent l'excitabilité des neurones sérotoninergiques

5-HT_{1A} and 5-HT_{2B} receptor interaction and co-clustering regulates serotonergic neuron excitability.

5-HT receptor cross-talks shape 5-HT neuron function

Amina Benhadda, Célia Delhaye, Imane Moutkine, Xavier Marques, Marion Russeau, Corentin Le Magueresse, Anne Roumier, Sabine Lévi, and Luc Maroteaux

Institut du Fer à Moulin, U1270 INSERM, Sorbonne Université, 17 rue du Fer à Moulin 75005, Paris, France

Abstract

Many psychiatric diseases including depression, schizophrenia and anxiety have been associated with serotonin (5-HT) signaling dysfunction. We previously showed that the 5-HT_{2B} receptor was expressed by 5-HT neurons together with 5-HT_{1A} receptors. Whether 5-HT_{2B} and 5-HT_{1A} receptors interact and the functional consequences of this putative interaction are unknown. Using co-immunoprecipitation, BRET, confocal and super-resolution microscopy in hippocampal cultured neurons, we found that 5-HT_{1A} and 5-HT_{2B} receptors form heterodimers and co-cluster at the surface of dendrites. The 5-HT_{2B} receptor cell-surface expression was reduced and the clusters were redistributed upon expression of the 5-HT_{1A} receptor suggesting functional interactions between the two receptors. Furthermore, the expression of the 5-HT_{2B} receptor prevented the 5-HT_{1A} receptor agonist-induced internalization, whereas the presence of the 5-HT_{1A} receptor mimicked the effect of the stimulation of the 5-HT_{2B} receptor on its surface expression. These data demonstrate a direct crosstalk between 5-HT_{1A} and 5-HT_{2B} receptors. To investigate the functional impact of this interaction *in-vivo*, we assessed 5-HT neuron excitability from mice lacking 5-HT_{2B} receptors in 5-HT neurons. We found upon 5-HT_{1A} receptor stimulation that the firing activity of 5-HT neurons was increased in the absence of 5-HT_{2B} receptors and decreased in its presence through regulation of SK channels, thus demonstrating the functional significance of these receptor interactions.

INTRODUCTION

Many psychiatric diseases including depression, schizophrenia or anxiety have been associated with serotonin (5-HT) signaling dysfunctions (Mann, 1999; Arango et al., 2003; Marazziti, 2017). Dorsal raphe serotonin neurons (DR) and their long-range projections exert control over many physiological functions such as emotion, sleep, and locomotion. With the exception of 5-HT₃ receptors (5-HT₃-Rs), which are ion channels, all 5-HT-Rs are G-protein coupled receptors (GPCR) that differ according to their G-protein coupling.

The 5-HT₁-Rs subtypes are coupled to the G α i/o protein and their activation leads to a decrease in intracellular cAMP (Lin et al., 2002). The 5-HT_{1A}-R is expressed in the central nervous system as an autoreceptor (expressed by 5-HT neurons), and as a heteroreceptor in neurons from several brain structures including hippocampus and prefrontal cortex (Garcia-Garcia et al., 2014; Andrade et al., 2015; Albert and Vahid-Ansari, 2019). Through the G β γ subunit, 5-HT_{1A}-R activation can induce the opening of potassium channels (G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels or GIRKs) that hyperpolarize 5-HT neurons and inhibit their firing (Llamosas et al., 2015; Montalbano et al., 2015; Courtney and Ford, 2016). The selective agonist 8-OH-DPAT preferentially couples to G α i3, whereas buspirone, another selective agonist, activates G α i3, G α o, and G α i2. In addition, 8-OH-DPAT failed to modify forskolin-stimulated cAMP accumulation, which was inhibited by buspirone, confirming different profiles of agonist efficacy in presynaptic 5-HT_{1A}-R-associated responses (Valdizán et al., 2010). Activation of the human 5-HT_{1A}-R expressed in *Xenopus* oocytes with GIRKs showed a relative order of efficacy for the activation of GIRK currents with 5-HT > 8-OH-DPAT (Heusler et al., 2005). In 5-HT neurons, 5-HT_{1A}-R expression is located to the somatodendritic compartment of 5-HT neurons, and 5-HT_{1B}-R (a 5-HT_{1A}-R close relative) expression is restricted to synaptic projections (McDevitt and Neumaier, 2011). 5-HT_{1A} autoreceptors are subject to homologous or heterologous desensitization, which is the result of receptor internalization (Riad et al., 2001).

The 5-HT₂-Rs subtypes (5-HT_{2A}, 2B, 2C) are coupled to the G α q/11 protein that activates phospholipase C (PLC) and increases inositol triphosphate (IP3) and Ca²⁺ intracellular concentration. A loss of function of the gene encoding 5-HT_{2B}-Rs, is associated with impulsivity, a higher risk of developing depression and suicidal behavior (Bevilacqua et al., 2010; Tikkanen et al., 2015). Using behavioral and biochemical experiments, Diaz et al. (2012) showed that 5-HT_{2B}-Rs are expressed with 5-HT_{1A}-Rs in serotonergic neurons as validated by RNAseq (Niederkofler et al., 2016; Okaty et al., 2020) (see https://bokaty.shinyapps.io/DR_Pet1_neuron_scrRNAseq_DB/) and are required for selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI)-induced extracellular 5-HT accumulation, pro-neurogenic, and behavioral effects. The acute or chronic activation of 5-HT_{2B}-Rs by the preferential agonist BW723C86 (BW) is able to mimic SSRI effects in mice (Diaz et al., 2012). In mice lacking the 5-HT_{2B}-R specifically in 5-HT neurons (cKO^{5-HT} mice), behavioral and molecular responses to SSRIs are as well abolished. Moreover, in WT mice, the activation of 5-HT_{2B}-Rs by BW is able to counteract the effects of 5-HT_{1A} autoreceptor activation, such as the decrease in 5-HT neurons firing rate and in body temperature (Belmer et al., 2018). Previous work by our team revealed that the expression of 5-HT_{2B}-Rs in hippocampal neurons is restricted to the somato-dendritic compartment, where they form clusters (Benhadda et al., 2021). Selective agonist stimulation concentrates 5-HT_{2B}-Rs in clusters. Although 5-HT_{2B}-Rs are expressed by serotonergic neurons together with 5-HT_{1A}-Rs, putative signaling interactions between these receptors are not yet documented.

The serotonergic tone of the DR neurons is known to be regulated by 5-HT_{1A}-Rs expressed on their dendritic surface (autoreceptors) that, when activated, open GIRK channels, hyperpolarize 5-HT neurons, and thereby inhibit cell firing. Activity-dependent release of 5-HT within serotonergic raphe nuclei activates these autoreceptors, thus completing an

autoinhibitory feedback loop (Montalbano et al., 2015). Small-conductance Ca^{2+} -activated potassium (SK) channels are responsible for the medium afterhyperpolarisation (mAHP) that follows action potentials in neurons (Kirby et al., 2003). Increasing the Ca^{2+} affinity of SK channels was shown to slow spontaneous firing by increasing the amplitude and duration of the apamin-sensitive mAHP, whereas decreasing the Ca^{2+} affinity of SK channels enhances neuronal excitability and switches the pacemaker-like firing pattern to burst firing. SK channels are thus able to tune the excitability of monoamine neurons (Ji et al., 2009). We previously reported that mice lacking 5-HT_{2B}-Rs exclusively in dopamine neurons, which also express SK channels (Jacobsen et al., 2008), exhibit a fairly strong increase in bursting activity (repeated action potentials separated by a small interval) of these neurons (Doly et al., 2017). In *Xenopus laevis* oocytes, activation of 5-HT_{1A}-Rs by 8-OH-DPAT can also regulate mAHP mediated by SK channels (Grunnet et al., 2004). Apamin, a neurotoxin from bee venom, which is a potent antagonist of SK channels and in particular of SK2 and SK3 subtypes, has been shown to increase 5-HT neuron burst firing in DR and extracellular 5-HT levels (Crespi, 2009) via a direct action (Rouchet et al., 2008). Nevertheless, regulation of the firing pattern of 5-HT neurons by 5-HT autoreceptors is poorly understood (Andrade et al., 2015). 5-HT_{1A}-Rs and 5-HT₂-Rs have been shown to crosstalk (Kidd et al., 1991), but no detailed studies of these interactions have been performed. The aim of this work was thus to understand if and how 5-HT_{2B}-Rs interact with 5-HT_{1A}-Rs and the putative impact of this interaction on their respective signaling pathways and physiological functions.

By studying their expression in different cell types (COS-7 cells, primary cultures of hippocampal neurons, and *in-vivo* raphe 5-HT neurons) using various pharmacological, electrophysiological and imaging techniques, we show that the 5-HT_{2B}-R can form dimers with the 5-HT_{1A}-R. This interaction has no apparent effect on their second messenger signalization and their respective ligand binding properties. However, we found that this interaction alters the cell-surface expression of these receptors (clustering, redistribution) during responses to specific ligands and thus their signaling, and ultimately controls the excitability of 5-HT neurons *in-vivo*.

Materials and methods

Generation and use of mice

Floxed mice, *Htr2b*^{tm2Lum}/*Htr2b*^{tm2Lum}, (IMSR Cat# EM:05939, RRID: IMSR_EM:05939) (cWT) were generated on a mixed B6;129S2 background and backcrossed >10 times onto the 129S2 strain. *Htr2b*^{lox/lox} mice were inactivated for *Htr2b* in 5-HT neurons by crossing with *129S2.Cg-Tg(Fev-cre)*^{1Esd}/0 (IMSR Cat# JAX:012712, RRID:IMSR_JAX:012712) (ePet1-Cre BAC transgenic mice or *Pet1-Cre*⁺⁰) (Scott et al., 2005) generating *129S2.Cg-Pet1-Cre*⁺⁰; *Htr2b*^{lox}/*Htr2b*^{lox} conditional knockout mice (cKO^{5-HT}) and littermate controls (cWT) (Belmer et al., 2018). For electrophysiology, these strains of mice were further crossed with *Gt(ROSA)26Sor*^{tm1(CAG-EGFP)^{Fsh}}/*Gt(ROSA)26Sor*⁺ (MGI Cat# 4420760, RRID:MGI:4420760) (Rosa26;CAG-loxP-STOP-loxP-EGFP or RCE) that crossed with *Pet1-Cre*⁺⁰ generated (Pet1-GFP) that express GFP in Pet1-positive 5-HT neurons only after Cre recombination cWT-RCE, and in the presence of floxed allele generated conditional knockout mice (cKO^{5-HT}-RCE) that express GFP in Pet1-positive 5-HT neurons.

All mice were bred at our animal facility. Food and water were available *ad libitum*. The temperature was maintained at 21±1°C, under 12/12h light/dark. Mice were moved to the experimental room in their home cage at least 5 days prior to testing to allow for habituation to the environment. All experiments involving mice were approved by the local ethical committee, Ethical Committee for Animal Experiments of the Sorbonne University, Charles Darwin C2EA - 05 (authorizations N°APAFIS#28228, and APAFIS#28229). All efforts were

made to minimize animal suffering. Results are described in accordance with the ARRIVE guidelines for reports in animal research (Percie du Sert et al., 2020).

Experimental design and statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7 software. Starting from our experience in previous publications (Belmer et al., 2018; Benhadda et al., 2021), we calculated the standard deviation of each group of animals for each test as well as the differences between the means of these groups. By setting the type I and II error risks at 5 and 20%, respectively, the size of the groups were determined by calculating the statistical power using the G*Power software version 3.1.9.6. To ensure reproducibility, when relevant, experiments were performed at least three times independently. To avoid litter bias in the mouse experiments, experimental groups are composed of animals from different litters randomly distributed using Graphpad software. All analyses were conducted with blinding to the experimental condition. Putative outliers were determined by the ROUT method. Data are presented as bars and the line at the mean \pm S.E.M. (standard error of the mean). Comparisons between two groups following a normal distribution were analyzed using two-tailed unpaired t-test with or without Welch's correction. Normality was assessed using the D'Agostino & Pearson omnibus normality test. All data normally distributed for more than two groups were examined by either ordinary or repeated measure two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* comparisons. $P < 0.05$ was predetermined as the threshold for statistical significance.

Viral constructs and stereotaxic injection

To express HA-tagged 5-HT_{2B}-R and Flag-tagged 5-HT_{1A}-R specifically in 5-HT neurons, we use a Double floxed Inverse Orientation (DIO) adeno-associated virus (AAV) construct that allows Cre-mediated expression of the transgene (pAAV-EF1A-DIO-WPRE-pA vector; RRID Addgene_39320) (Belmer et al., 2018). The viruses packaged into AAV2.9 serotype with titers of 10^{12} – 10^{13} viral particles / ml were obtained (UNC Vector Core, Chapel Hill USA). AAVs were injected in the B7 raphe nuclei of *Pet1-Cre⁺⁰* mice following described procedure (Muzerelle et al., 2016). Respective expression was assessed by immunostaining using a mouse anti-HA antibody (1:500; Cell Signaling#2367, RRID AB_10691311 and a rabbit anti-Flag (1:500; Cell Signaling#14793 RRID AB_2572291 followed by Cy5-conjugated donkey anti-mouse (1.9 μ g/ml; Jackson ImmunoResearch#715-175-150, RRID AB_2340819) and the Cy3-conjugated goat anti-rabbit antibody (1.9 μ g/ml; Jackson ImmunoResearch#111-165-003, RRID AB_2338000).

Culture of COS-7 cells

COS-7 cells were cultured as monolayers in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (Biowest) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma), in 9-cm dishes (Falcon). Cells were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Cells 70% confluent in 6-well plates were used for inositol phosphate accumulation and surface biotinylation, in 24-well plates for surface binding, in 9-cm dishes for total binding and co-immunoprecipitation/Western-blot and in 96-well plates for BRET experiments. They were then transfected with pCAGG vectors using the Genejuice transfection reagent (Merck Millipore) in complete DMEM, according to the manufacturer's instructions. Twenty-four hours before the experimental test, cells were incubated in a serum-free medium.

Co-immunoprecipitation

Co-immunoprecipitation and Western-blotting were performed as previously described (Moutkine et al.). COS-7 cells transfected with a total of 10 μ g of DNA per 9-cm dishes with a ratio of 7:3 (HA-5-HT_{2B} / empty vector; empty vector / myc-5-HT_{1A}; HA-5-HT_{2B} / myc-5-

HT_{1A}) and maintained in culture for three days before harvesting. Cells were centrifuged and suspended in CHAPS lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.05 mM EDTA, 10 mM CHAPS, and protease inhibitor cocktail, pH 7.4) and sonicated three times for 30 s. Cells were next solubilized for 5 h at 4°C under gentle agitation. Lysates were centrifuged (20,000 x g) in order to pellet non-solubilized membranes. Protein concentrations in supernatant were measured using the Pierce™ Coomassie Protein Assay Kit. Lysates were co-immunoprecipitated with anti-HA beads (HA-Tag C29F4 Rabbit mAb Sepharose® Bead Conjugate Cell Signaling #3956 RRID:AB_10695091) overnight at 4 °C under gentle agitation. Total lysate and immunoprecipitated proteins were separated by SDS/PAGE onto 10% acrylamide gels and transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes. Inputs represent 5% of the total protein amount used for immunoprecipitations. Blots were probed with rabbit anti-HA (1:1,000; Cell Signaling#3724, RRID AB_1549585) or mouse anti-myc (1:1,000; Cell Signaling#2276, RRID AB_331783). Secondary antibodies (1:10,000; goat anti-mouse-IR800, Advansta# R-05060-250 and goat anti-rabbit-IR700, Advansta# R-05054-250) were used as secondary antibodies. Immunoreactive bands were detected using the Odyssey software. At least three independent experiments were performed.

Bioluminescence resonance energy transfer (BRET)

BRET assays were performed according to published methods (Moutkine et al., 2017). Briefly, in 6-well plates, COS-7 cells were transfected with 30-100 ng of plasmid DNA coding for the BRET donor (5-HT_{2B}-R-Rluc) (Moutkine et al., 2017) and an increasing amount of BRET acceptor plasmids (5-HT_{1A}-R-YFP; from 100 to 4000 ng/well). Twenty-four hours later, the cells were trypsinized (trypsin 0.05% EDTA; Invitrogen) and plated in 96-well plates (50,000 cells/well). The day after, the luciferase substrate, coelenterazine-h, was added in each well at a 5 µM final concentration. Using a Mithras LB940 plate reader, luminescence and fluorescence were then measured simultaneously at 485 and 530 nm, respectively. The BRET ratios were calculated as ((emission at 530 nm/emission at 485 nm)-(background at 530 nm/background at 485 nm)) and were plotted as a function of ((YFP-YFP0)/YFP0)/(Rluc/Rluc0). The background corresponds to signals in cells expressing the Rluc fusion protein alone under the same experimental conditions. YFP is the fluorescence signal at 530 nm after excitation at 485 nm, and Rluc is the signal at 485 nm after addition of coelenterazine-h. YFP0 and Rluc0 correspond to the values in cells expressing the Rluc fusion protein alone.

Binding experiments

Membrane radioligand binding assay

Membrane binding assays were performed on transfected cells plated in 9-cm dishes (Belmer et al., 2018). Cells were first washed with PBS, scraped into 10 ml of PBS on ice, and then centrifuged for 5 min at 1000 g. Cell pellets were dissociated and lysed in 2 ml of binding buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) and centrifuged for 30 min at 10,000 g. Membrane preparations were then resuspended in binding buffer to obtain a final concentration of 0.2–0.4 mg of protein/well. Aliquots of membrane suspension (200 µl/well) were incubated with 25 µl/well of ³H-mesulergine or ³H-8-OH-DPAT at a final concentration between half the K_d and the K_d for each 5-HT-R, diluted in binding buffer and 25 µl/well of increasing concentrations of heterologous compound. 5-HT_{2B}-R agonist BW-723C86 (BW) or antagonist RS-127445 (RS), 5-HT_{1A}-R agonist 8-OH-DPAT or antagonist NAN-190 (NAN) were from Tocris (UK). Competition was performed at concentration between 10⁻¹¹ to 10⁻⁵ M, diluted in binding buffer in 96-well plates for 60 min at room temperature. Membranes were harvested by rapid filtration onto Whatman GF/B glass fiber filters (Brandell) pre-soaked with cold saline solution and washed three times. Filters were placed in 6-ml scintillation vials and

counted. Data in disintegrations/min were converted to femtomoles and normalized to protein content (ranging from 0.1 to 1 mg/well). At least three independent experiments were performed in duplicate.

Non-permeabilized whole cell radioligand binding assay

Cells expressing 5-HT_{2B}-Rs and/or 5-HT_{1A}-Rs were plated in 24-well clusters. Twenty-four hours before the experiment, the cells were incubated in serum-free medium overnight. The next day, the medium was replaced by 400 µl/well of Krebs-Ringer/Hepes buffer (130 mM NaCl, 1.3 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 10 mM Hepes, 10 mM glucose, pH 7.4). Then, 50 µl of [³H]-mesulergine were diluted in Krebs-Ringer/Hepes buffer at a final concentration near the K_d value of 5-HT_{2B}-R. The radioligand was competed with 50 µl of increasing concentrations of non-radioactive BW, also diluted in Krebs-Ringer/Hepes buffer. Cells were then incubated for 30 min at room temperature and then washed twice on ice with cold PBS. Washed cells were solubilized by the addition of 500 µl of SDS 1%. The next day, 3 ml of scintillation mixture were added to the samples, and the radioactivity was counted. Data in disintegrations/ min were converted to femtomoles and normalized to protein content (0.2–0.4 mg of protein/well). At least three independent experiments were performed in duplicate.

Second messenger measurements

COS-7 cells were transfected with 3 µg of DNA (1:1 ratio for co-transfection) in 6-well plates using Genejuice transfecting reagent in complete medium. Twenty-four hours later the cells were trypsinized (trypsin 0.05% EDTA; Invitrogen) and plated in 96-well plates (30,000 cells/well). The next day, the complete medium was replaced by a serum-free medium.

HTRF IP accumulation

The day of the experiment, media were replaced by stimulation buffer with LiCl to prevent IP1 degradation (NaCl, 146 mM, KCl, 4.2 mM, MgCl₂, 0.5 mM, CaCl₂, 1 mM, Hepes, 10 mM, glucose, 5.5 mM, LiCl, 50 mM, pH7.4). Cells were stimulated during 2 h at 37°C with a different concentration of BW (10⁻¹¹ to 10⁻⁶ M in stimulation buffer). Stimulation solution was replaced by a lysis buffer (IP one HTRF Kit, Cisbio, France) during 1 h. Lysates were distributed to 384-well plates, and IP was labeled using HTRF reagents. The assay is based on a competitive format involving a specific antibody labeled with terbium cryptate (donor) and IP coupled to d2 (acceptor). After a 1-h incubation with HTRF reagent, the plate was read using Mithras LB940 plate reader according to the manufacturer's instructions. Modelization and EC50 calculation were done using GraphPad Prism 7 software. At least three independent experiments were performed in duplicate.

Surface biotinylation

Surface biotinylation was performed on transfected COS-7 cells. Briefly, cells were initially washed twice in cold PBS and subsequently incubated in PBS containing 1 mg/ml Sulfo-NHS-SS-Biotin for 30 min at 4°C to allow for labelling of all surface membrane proteins. Reaction was stopped by applying a quench solution (100 mM Tris pH 8 in PBS) to remove excess biotin. Biotinylated cells were then homogenized in RIPA buffer containing 25 mM Tris (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1% TritonTM X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1mM NaF and a cocktail of protease inhibitors (Roche). The lysate was centrifuged at 21,000 g to remove nuclei and cellular debris. A small amount of the lysate was removed and constituted the "input" or total lysate. Then, 100 µl of StreptaAvidin beads (Thermo Scientific Inc) were added to 40 µg of protein lysate and placed on a rotator at 4°C overnight. Samples were then washed three times in RIPA buffer and a fourth times in RIPA buffer without detergents (25 mM Tris

pH 7.6, 150 nM NaCl, 0.5% Triton™ X-100; protease inhibitor); beads were pulled-down after each wash by 1 min centrifugation. Bound proteins were eluted in SDS reducing buffer and heated at 70°C for 5 min.

Western blotting

For co-immunoprecipitation and surface biotinylation experiments, total lysate and immunoprecipitated proteins were separated by SDS/PAGE onto 10% acrylamide gels and transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes. Blots were probed with rabbit anti-HA (1:1,000; Cell Signaling#3724, RRID AB_1549585) or mouse anti-myc (1:1,000; Cell Signaling#2276, RRID AB_331783). Secondary antibodies (1:10,000; goat anti-mouse-IR800, Advansta# R-05060-250 and goat anti-rabbit-IR700, Advansta# R-05054-250) were used as secondary antibodies. Immunoreactive bands were detected using the Odyssey software. At least three independent experiments were performed.

Hippocampal neuronal culture and transfection.

Hippocampal neurons were prepared from embryonic day 19 Sprague-Dawley rat pups as previously described (Benhadda et al., 2021). Dissected tissues were trypsinized (0.25% v/v) and mechanically dissociated in HBSS (CaCl₂ 1.2 mM, MgCl₂ 0.5 mM, MgSO₄ 0.4 mM, KCl 5 mM, KH₂PO₄ 0.44 mM, NaHCO₃ 4.1 mM, NaCl 138 mM, Na₂HPO₄ 0.34 mM, D-Glucose 5.5 mM) containing 10 mM Hepes (Invitrogen). Dissociated cells were plated on glass coverslips (Assistent) precoated with 55 µg/ml poly-D,L-ornithine (Sigma-Aldrich) in plating medium composed of MEM supplemented with horse serum (10% v/v; Invitrogen), L-glutamine (2 mM), and Na pyruvate (1 mM, Invitrogen) at a density of 3.4×10^4 cells/cm² and maintained in humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. After attachment for 2-3 h, cells were incubated in maintenance medium that consists of Neurobasal medium supplemented with B27, L-glutamine (2 mM), and antibiotics (Invitrogen). Each week, one-third of the culture medium volume was renewed. Neuronal transfection with plasmids encoding HA-5-HT_{2B}-R, Myc-5-HT_{1A}-R and eGFP were performed at 13–14 DIV using Transfectin (Bio-Rad), according to the instructions of the manufacturer (DNA/lipofectant ratio of 1:3), with 1.5 µg of plasmid DNA per 20-mm well. The following ratio of plasmid DNA was used in co-transfection experiments: 1:0.3:0.2 µg for HA-5-HT_{2B}-R / Myc-5-HT_{1A}-R / eGFP. Experiments were performed 7–10 days after transfection.

Immunostaining

The total (membrane plus intracellular) pools of 5-HT_{2B}-Rs were revealed with immunocytochemistry in fixed and permeabilized cells, whereas the membrane pool of HA-5-HT_{2B} and myc-5-HT_{1A} was done in non-permeabilized cells. To label the total pool of 5-HT_{2B}-Rs, cells were fixed for 10 min at room temperature in paraformaldehyde (PFA; 4% w/v; Sigma) and sucrose (30% w/v; Sigma) solution in PBS. Cells were then washed in PBS, and permeabilized for 4 min with Triton X-100 (0.25% v/v) in PBS. After washes, non-specific staining was blocked for 30 min with goat serum (20% v/v; Invitrogen) in PBS. Neurons were then incubated for 1 h with either the rabbit anti-HA antibody (1:500; Cell Signaling #3724, RRID AB_1549585) or the mouse anti-myc antibody (1:500; Cell Signaling #2276, RRID AB_331783) in PBS supplemented with Goat Serum (GS) (3% v/v). Cells were then washed three times and incubated for 45 min with Cy5-conjugated donkey anti-mouse or Alexa 488 donkey anti-mouse antibodies (1.9 µg/ml; Jackson ImmunoResearch # 715-175-150, RRID AB_2340819 or #715-175-150, RRID AB_2336933) or the Cy3-conjugated goat anti-rabbit antibody (1.9 µg/ml; Jackson ImmunoResearch # 111-165-003, RRID AB_2338000) in PBS-BSA-goat serum blocking solution, washed, and mounted on slides with Mowiol 4-88 (48 mg/ml).

In experiments using BW723C86, 5-HT, or 8-OH-DPAT, the drug was diluted in imaging medium and applied to neurons for 10 or 20 min at 1 μ M final concentration before fixation and immunolabeling. The imaging medium consisted of phenol red-free MEM supplemented with glucose (33 mM), Hepes (20 mM), glutamine (2 mM), Na⁺-pyruvate (1 mM), and B27 (1X, Invitrogen). Sets of neurons to be compared were labeled and imaged simultaneously.

Fluorescence image acquisition and cluster analyses

Fluorescence image acquisition and analyses were performed as previously described (Benhadda et al., 2021). Images were obtained on a Leica SP5 confocal microscope using the LAS-AF program (Leica). Stacks of 16–35 images were acquired using a 100 X objective with an interval of 0.2 μ m and an optical zoom of 1.5. Image exposure time was determined on bright cells to avoid pixel saturation. All images from a given culture were then acquired with the same exposure time. Quantifications of 5-HT_{2B}-R clusters were performed using MetaMorph software (Roper Scientific) on projections (sum of intensity) of confocal optical sections. For each cell, a region of interest (ROI) was chosen. For 5-HT_{2B}-R cluster analysis, images were first flattened background filtered (kernel size, 3 x 3 x 2) to enhance cluster outlines, and a user-defined intensity threshold was applied to select clusters and avoid their coalescence. Thresholded clusters were binarized, and binarized regions were outlined and transferred onto raw data to determine the mean 5-HT_{2B}-R cluster number, area and fluorescence intensity. The dendritic surface area of regions of interest was measured to determine the number of clusters per 10 μ m². As the 5-HT_{1A}-R presents a diffuse expression pattern, the average fluorescent intensity per pixel was measured in a defined ROI. For each culture, we analyzed 7-12 dendrites per experimental condition. A total of about 10 neurons were analyzed per condition from three to five independent cultures. The experimenter was blind to the culture treatment.

STORM imaging

STochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) imaging was conducted on an inverted N-STORM Nikon Eclipse Ti microscope equipped with a 100 \times oil-immersion TIRF objective (NA 1.49) and an Andor iXon Ultra 897 EMCCD camera using 405 and 638 nm lasers from Coherent. Movies of 30,000 frames were acquired at frame rates of 50 Hz. The z position was maintained during acquisition by a Nikon Perfect Focus System and multicolor fluorescent microspheres (Tetraspeck, Invitrogen) were used as markers to register long-term acquisitions and correct for lateral drifts. Single-molecule localization and 2D image reconstruction was conducted as described in (Specht et al., 2013) by fitting the PSF of spatially separated fluorophores to a 2D Gaussian distribution. The surface of clusters and the densities of molecules per μ m² were measured in reconstructed 2D images through cluster segmentation based on detection densities. The threshold to define the border was set to 1000 detections/ μ m². All pixels containing <2 detections were considered empty, and their intensity value was set to 0. The intensity of pixels with 2 detections was set to 1. The resulting binary image was analyzed with the function “regionprops” of Matlab to extract the surface area of each cluster identified by this function. Density was calculated as the total number of detections in the pixels belonging to a given cluster, divided by the area of the cluster.

Electrophysiology

For patch clamp experiments, 260 μ m-thick brain coronal slices were prepared from cWT-RCE mice (control) and cKO^{5-HT}-RCE mice at 4 weeks (25-31 postnatal days) that express GFP only in Pet1-positive 5-HT neurons. The brain extraction and slicing was performed in ice-cold (0–4°C) oxygenated (95% O₂-5% CO₂) solution containing 110 mM choline chloride, 2.5 mM KCl, 25 mM glucose, 25 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 0.5 mM CaCl₂, 7 mM MgCl₂, 11.6

mM L-ascorbic acid, and 3.1 mM sodium pyruvate. Slices were then stored in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 25 mM glucose, 25 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, and 1 mM MgCl₂ (pH 7.2, maintained by continuous bubbling with 95% O₂-5% CO₂). Slices were incubated in aCSF at 32°C for 20 min and then at room temperature (20–25°C). Slices were transferred to the recording chamber where they were continuously superfused with oxygenated aCSF (30–32°C). To block synaptic transmission, we added to the aCSF 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX; 10 μM, Hello Bio), D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-APV; 50 μM, Hello Bio) and SR95531 hydrobromide (GABAzine, 10 μM, Hello Bio). We also used (±) 8-hydroxy-2-(dipropylamino)tetralin hydrobromide (8-OH-DPAT; 30nM, SIGMA) and Apamin (20nM, Hello Bio) to activate 5-HT_{1A} receptors and block SK channels, respectively. Current clamp and voltage clamp recordings were performed with pipettes (5- to 7-MΩ resistance) prepared from borosilicate glass (BF150-86-10; Harvard Apparatus) using a DMZ pipette puller (Zeitz). Pipettes were filled with an intracellular solution containing 105 mM K-gluconate, 10 mM HEPES, 10 mM phosphocreatine-Na, 4 mM ATP-Na₂, and 30 mM KCl (pH 7.25, adjusted with KOH). The input resistance (R_{input}) was computed using a 10-mV hyperpolarizing step from a holding potential of -65 mV (50 ms). Current-clamp and voltage-clamp recordings were performed using an EPC-10 amplifier (HEKA Elektronik). Data acquisition was performed using Patchmaster software (Heka Elektronik). The liquid junction potential (-5 mV) was left uncorrected. Signals were sampled at 20 kHz and filtered at 4 kHz. Data analysis was performed using Igor Pro (Wavemetrics). Statistical analyses were performed using Prism (GraphPad). The normality of data distribution was tested using Shapiro–Wilk's test. Unpaired two-tailed *t* tests (for normally distributed datasets) or Mann–Whitney tests (for non-normally distributed datasets) were used for comparisons between two groups. For multiple comparisons, we used two-way ANOVA followed by Sidak's test. Values of *p* < 0.05 were considered statistically significant.

Materials availability

All newly created materials can be accessed by asking to the authors.

Acknowledgements

We thank the *Cell and Tissue Imaging Facility* of the Institut du Fer à Moulin (namely Theano Eirinopoulou, Mythili Savariradjane), where all image acquisitions and analyses have been performed, Aude Muzerelle for help with stereotaxic viral injections, and the staff of the IFM animal facility (namely Baptiste Lecomte, Gaël Grannec, François Baudon, Anna-Sophia Mourenco, Emma Courteau and Eloise Marsan).

This work has been supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE16-0008, ANR-11-IDEX-0004-02), the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM DEQ2014039529) and the Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC-2019-19F10).

Author contributions

C.L., S.L., L.M., and A.R. designed the studies. A.B., C.L, A.R and L.M. wrote the manuscript, all authors revised it. A.B., I.M., X. M., and M.R. performed pharmacological studies, BRET experiments, stereotaxic and *in-vivo* experiments, immunofluorescence, image acquisition and analysis with the help of S.L., C.D., and C.L. performed and analyzed the electrophysiology experiments. A.B., S.L., L.M., and A.R. performed data analysis.

RESULTS

Coexpression of 5-HT_{2B}-Rs with 5-HT_{1A}-Rs revealed receptor/receptor interactions- We previously showed that 5-HT_{2B}-Rs and 5-HT_{1A}-Rs are coexpressed in 5-HT neurons (Diaz et al., 2012) and have opposite action on their activity (Belmer et al., 2018) that may result from reciprocal interactions. To assess putative 5-HT_{2B}-R and 5-HT_{1A}-R interactions, we first performed co-immunoprecipitation experiments in COS-7 cells co-transfected with plasmids coding for HA-tagged 5-HT_{2B}-Rs and/or myc-tagged 5-HT_{1A}-Rs. Extracted proteins were then immunoprecipitated using anti-HA beads followed by Western blotting revealing co-immunoprecipitation between 5-HT_{1A}-Rs and 5-HT_{2B}-Rs (**Fig. 1A**). We completed these data by performing BRET experiments to assess putative close interactions between the 5-HT_{1A}-R and 5-HT_{2B}-R. This experiment relies on the natural capacity of Renilla luciferase, used here as BRET donor, to emit energy in presence of its substrate, coelenterazine or to transfer it to an acceptor. Luciferase coding region and yellow fluorescent protein (YFP, here, BRET acceptor) were fused to the C-terminal coding region of 5-HT_{1A}-R and 5-HT_{2B}-R. Constant amounts of BRET donor plasmids and increasing amounts of BRET acceptor plasmids were transfected in COS-7 cells. A hyperbolic curve confirms the specific interactions between the BRET donor with the acceptor and thus, the close proximity between the two receptors studied. Hyperbolic curve was obtained when 5-HT_{2B}-Rs and 5-HT_{1A}-Rs were expressed together supporting that they can form heterodimers in intact cells (**Fig. 1B**). As control, no BRET signal was obtained when the 5-HT_{2B}-R was tested for self-association, as shown in a previous study indicating that this receptor is unable to form homodimer (Moutkine et al., 2017). Thus, co-immunoprecipitation and BRET experiments show that 5-HT_{1A}-Rs and 5-HT_{2B}-Rs can interact closely and may form heteromers.

Total receptor expression and second messenger coupling are not affected by 5-HT_{2B}-R /5-HT_{1A}-R coexpression- We assessed if coexpression of 5-HT_{1A}-Rs and 5-HT_{2B}-Rs affect their respective intracellular signaling pathway, inositolphosphate (IP) or cAMP and pharmacological properties. Radioligand binding competition by increasing concentrations of BW or NAN of tritiated mesulergine or tritiated 8-OH-DPAT, for 5-HT_{2B}-R and 5-HT_{1A}-R, respectively, was performed on total membrane proteins from transfected COS-7 cells expressing 5-HT_{2B}-Rs with or without 5-HT_{1A}-Rs. No difference was found in total expression of the receptors, which is represented by the Bmax, that reflects the amount of available receptors, nor in binding affinity to their respective ligand (Ki) in coexpressing compared to single receptor expressing cells (**Fig. 2A-B**). Using HTRF-based assays, we measured the intracellular IP amount produced by agonist stimulation of 5-HT_{2B}-Rs, BW. Dose-response curve of 5-HT_{2B}-R-mediated production of IP in response to BW in cells expressing 5-HT_{2B}-Rs alone or in combination with 5-HT_{1A}-Rs were analyzed using the operational model to determine the Gαq coupling efficiency of single receptor and heterodimer. The dose response curves showed no significant difference in the EC50 between the 2 conditions (**Fig. 2C**). These results suggest that 5-HT_{1A}-Rs and 5-HT_{2B}-Rs coexpression modifies neither their expression nor the 5-HT_{2B}-R coupling efficiency.

5-HT_{2B}-Rs/5-HT_{1A}-Rs coexpression decreases 5-HT_{2B}-R surface expression- As the total expression level and the coupling properties of the receptors were not modified by their coexpression, we investigated putative changes in their cellular distribution. First, we performed surface binding assays on intact cells in order to evaluate their plasma membrane density. Using similar pharmacological protocol on non-permeabilized living cells, we observed that coexpression of the two receptors did not modify affinity but decreased the 5-HT_{2B}-R surface expression as evaluated by their Bmax; Bmax was significantly lower (by 60%) between 5-HT_{2B}-R alone compared to coexpression condition with 5-HT_{1A}-R (**Fig. 3A**) but no

difference was found in 5-HT_{1A}-R plasma membrane expression (not illustrated). To confirm this result, we performed surface biotinylation assay, which is a direct method to evaluate protein surface expression. To overcome fluctuations of total protein expression in different transfection, results were analyzed by the ratio of the surface/total protein expression for each receptor. The results showed that coexpression of the two receptors significantly decreased surface 5-HT_{2B}-R by 31% but not 5-HT_{1A}-R surface expression (**Fig. 3B-C**). Together, these data suggest that the 5-HT_{2B}-R surface expression is reduced by coexpression of 5-HT_{1A}-Rs, supporting functional interactions between the two receptors.

Neuronal distribution of 5-HT_{2B}-Rs compared to 5-HT_{1A}-Rs- We previously showed that 5-HT_{2B}-R expression was restricted to the somatodendritic compartment of hippocampal cultured neurons (Benhadda et al., 2021), and that 5-HT_{2B}-Rs can positively regulate 5-HT neuronal activity in an opposite manner to 5-HT_{1A}-Rs (Belmer et al., 2018). Independently, 5-HT_{1A}-Rs were shown to be expressed in the somatodendritic compartment of either 5-HT or hippocampal neurons *in-vivo* (Kia et al., 1996; Riad et al., 2000) and in cultures (Renner et al., 2012). However, even if 5-HT_{1A}-Rs and 5-HT_{2B}-Rs are both endogenously expressed in 5-HT neurons and hippocampal neurons, the lack of selective antibodies against these receptors makes studies on endogenous receptors impossible. We thus transfected hippocampal cultures with plasmids encoding HA-tagged-5-HT_{2B}-R and myc-tagged-5-HT_{1A}-R to study their cellular and subcellular distribution. Although these two receptors were expressed in the somatodendritic compartment, 5-HT_{1A}-Rs and 5-HT_{2B}-Rs displayed different expression patterns: 5-HT_{2B}-Rs were arranged in large clusters, whereas 5-HT_{1A}-Rs were detected as much smaller clusters at the surface of dendrites of hippocampal neurons (**Fig. 4A**). We confirmed in hippocampal cultured neurons that the coexpression of 5-HT_{1A}-Rs decreased the surface expression of 5-HT_{2B}-Rs by 40% compared to its total expression (**Fig. 4A**), as previously observed in COS cells (**Fig. 3C**). Next, we developed pAAV-EF1A-DIO-WPRE-pA viruses for stereotaxic injection into the B7 raphe nuclei of *Pet1-Cre⁺⁰* mice in order to express Flag-tagged-5-HT_{1A}-Rs and HA-tagged-5-HT_{2B}-Rs in DR 5-HT neurons. By this mean, we showed somatodendritic colocalization of both receptors in 5-HT neurons *in-vivo* (**Fig. 4B**). Together, these data suggest that 5-HT_{2B}-Rs and 5-HT_{1A}-Rs are in close proximity and may functionally interact in neurons.

Stimulation of 5-HT_{2B}-Rs increases 5-HT_{2B}-R surface clustering and maintains expression of 5-HT_{1A}-Rs at cell surface- In primary cultures of hippocampal neurons, we studied the subcellular distribution of both receptors using confocal microscopy. We quantified the number and size of 5-HT_{2B}-R clusters and the density of molecules per cluster (integrated intensity) with or without 5-HT_{1A}-R coexpression and following selective stimulation with the 5-HT_{2B}-R agonist BW (1 μ M). BW stimulation of 5-HT_{2B}-Rs for 20 min decreased the number of 5-HT_{2B}-R clusters (51%), increased the size (97%) and density of receptor per cluster (64%) (**Fig. 5A**). In the absence of stimulation, coexpression of 5-HT_{1A}-Rs decreased the number of 5-HT_{2B}-R clusters by 36% and increased their area by 73%, but did not alter their density (**Fig. 5A**), and selective stimulation by BW did not significantly alter these parameters. Selective stimulation of 5-HT_{1A}-R by 8-OH-DPAT (1 μ M) led to a reduction of 5-HT_{1A}-R expression at cell-surface, as shown by the decrease in surface 5-HT_{1A}-R fluorescence intensity over time (41%), which suggests an internalization process (**Fig. 5B**). Coexpression with 5-HT_{2B}-Rs resulted in a 34% increase in 5-HT_{1A}-R expression at cell-surface, which was maintained upon 8-OH-DPAT stimulation (**Fig. 5B**). This result suggests that the presence of 5-HT_{2B}-Rs increases 5-HT_{1A}-R clustering and prevents its 8-OH-DPAT-induced internalization thereby supporting their interaction. Clusters are small objects, and the 200-nm diffraction limit of confocal microscopy does not allow isolation of closely spaced clusters (**Fig. 6A**). Using

Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) technique with a resolution of 20 nm, we confirmed our initial observation: coexpression, without or with 5-HT_{2B}-R stimulation by BW (1 μ M), significantly decreased the 5-HT_{2B}-R cluster number (52% and 55%, respectively) and increased their area (292% and 50%, respectively) (**Fig. 6B-C**). Thanks to its better resolution compared to confocal microscopy, this technique revealed a small but significant potentiation by 2-fold of the effects of 5-HT_{1A}-R coexpression on 5-HT_{2B}-R cluster number upon BW stimulation of 5-HT_{2B}-Rs (**Fig. 6B-C**). Together, these results confirmed that the coexpression of 5-HT_{1A}-Rs could mimic some of the effect of 5-HT_{2B}-R stimulation by BW on its surface expression.

Selective stimulation of either 5-HT_{1A}-Rs or 5-HT_{2B}-Rs generates crossed effects on receptor clustering at the cell surface - Even if no alteration of 5-HT_{2B}-R transduction signaling was observed when this receptor was coexpressed with 5-HT_{1A}-Rs in COS cells, the neuronal redistribution of the receptor upon stimulation is of interest since it suggests local changes in its function. In the coexpression condition, 5-HT_{1A}-R surface expression increased by 28%, and when we selectively stimulated the 5-HT_{2B}-R with BW (1 μ M) for 20 min, we found a 28% decrease in the 5-HT_{1A}-R surface expression compared to the unstimulated coexpression condition (**Fig. 7A-B**). Conversely, in the coexpression condition, we observed a 49% decrease in the 5-HT_{2B}-R cluster number, and an increase in their size (by 99%) and integrated cluster intensity (by 89%) when 5-HT_{1A}-Rs were selectively stimulated by 8-OH-DPAT (1 μ M) for 20 min. These results indicate that stimulating 5-HT_{1A}-R increases its effects on 5-HT_{2B}-R clustering (**Fig. 7A-C**). These data suggest a cooperative association between 5-HT_{2B}-Rs and 5-HT_{1A}-Rs at the surface of neurons: the selective 5-HT_{1A}-R stimulation increasing 5-HT_{2B}-R clustering and the selective 5-HT_{2B}-R stimulation decreasing 5-HT_{1A}-R surface expression.

Co-stimulation of both receptors by 5-HT suppresses 5-HT_{2B}-R effect on 5-HT_{1A}-R clustering- Since 5-HT_{1A}-R and 5-HT_{2B}-R respective agonists have differential effects on the membrane clustering of the receptors, we investigated the effect of co-stimulation with their natural ligand, 5-HT (1 μ M), on their distribution. Surprisingly, stimulation with 5-HT did not modify 5-HT_{2B}-R cluster properties: the cluster density, as well as the cluster size and intensity were not affected by the coexpression of 5-HT_{1A}-Rs (**Fig. 8A**). On the contrary, stimulation of 5-HT_{1A}-R with 5-HT decreased its surface expression by 39% compared to unstimulated condition (**Fig. 8B**), and close to what was observed after 8-OH-DPAT application (**Fig. 5B**). When coexpressed with 5-HT_{2B}-Rs, 5-HT_{1A}-R surface expression increased by 24%, and 5-HT stimulation decreased this surface expression by 50%, this effect being fully reversed by the selective 5-HT_{2B}-R antagonist, RS (**Fig. 8B**). This result supports the notion that stimulating 5-HT_{1A}/5-HT_{2B} heterodimers by 5-HT somehow reverses the 5-HT_{2B}-R ability to maintain the 5-HT_{1A}-R at the plasma membrane by acting at 5-HT_{1A}-Rs (**Fig. 8B**). These data indicate a differential crosstalk according to agonist selectivity, 5-HT vs. 8-OH-DPAT or BW.

5-HT_{2B}-Rs/5-HT_{1A}-Rs control the firing of 5-HT neurons by acting at apamin-sensitive SK channels-

The serotonergic tone of the DR neurons is known to be regulated by GIRK channels, which hyperpolarize 5-HT neurons and inhibit cell firing, and by SK channels that are responsible for mAHPs, thereby controlling the burst firing of DR 5-HT neurons. We used patch-clamp recording on identified 5-HT neurons *ex-vivo* to study action potential firing frequency in response to depolarizing current steps in cWT-RCE mice and in cKO^{5-HT}-RCE mice. Basal Frequency-Intensity (F-I) curves for cWT and cKO^{5-HT} 5-HT neurons did not differ (**Fig. 9A**), and resting membrane potential and input resistance were similar (**Fig. 9B**). In the presence of

8-OH-DPAT (30 nM), the firing frequency of cKO^{5-HT} 5-HT neurons became significantly higher than that of cWT 5-HT neurons (**Fig. 9C**), while resting membrane potential and input resistance remained similar (**Fig. 9D**). In the presence of 8-OH-DPAT (30 nM) plus Apamin (20 nM), a selective SK2/3 channel blocker, F-I curves for cWT and cKO^{5-HT} 5-HT neurons were again similar (**Fig. 9E**) and higher than unstimulated condition, with resting membrane potential and input resistance remaining similar (**Fig. 9F**). These results indicate that, in the absence of 5-HT_{2B}-Rs, 5-HT neuron firing activity is increased upon 5-HT_{1A}-R stimulation through the regulation of SK channels, when 5-HT_{1A}-R can be internalized by 8-OH-DPAT, and decreased in the presence of 5-HT_{2B}-Rs, when 8-OH-DPAT cannot trigger internalization of 5-HT_{1A}-Rs, supporting a link between receptor functions and trafficking.

DISCUSSION

Combined with our previous investigations about 5-HT_{2B}-Rs expression in 5-HT neurons (Belmer et al., 2018) and the extensive studies on 5-HT_{1A}-Rs as autoreceptors of these neurons, the present work demonstrates 5-HT_{1A}-R/5-HT_{2B}-R interactions in the regulation of serotonergic tone, which is a prime importance for mood disorders. We found that 5-HT_{1A}-Rs and 5-HT_{2B}-Rs are colocalized within 5-HT neurons, and interact together to form dimers. This interaction modifies their cell-surface expression and distribution, which can be regulated upon specific ligand responses. Biophysically, upon clustering, membrane receptors have been shown to be more efficacious than freely moving molecules (Liu and Fuentes, 2019). Different techniques allowed us to validate the reciprocal effects on surface 5-HT_{1A}-R and 5-HT_{2B}-R. Confocal microscopy was used to analyze and compare in various conditions the number of clusters, their surface and the density of receptors per cluster. With a resolution up to ~20 nm, STORM allowed a more accurate analysis of receptor spatial distributions (MacDonald et al., 2015). With these techniques, we were able to show that stimulation by a specific 5-HT_{2B}-R agonist, BW, allows the formation of larger and denser clusters of 5-HT_{2B}-Rs at the surface of hippocampal neurons (**Fig. 10A**). This result validates our previous work on the effects of 5-HT_{2B}-R stimulation on its own clustering (Benhadda et al., 2021).

In contrast to the 5-HT_{1A} heteroreceptor, it has been shown that the 5-HT_{1A} autoreceptor desensitizes and is internalized upon stimulation (Bouaziz et al., 2014), although the detailed mechanisms involved remained unclear. Four PKC and two PKA phosphorylation sites were identified in human 5-HT_{1A}-R. PKC induces a rapid phosphorylation of the receptor at a stoichiometry of two phosphates per receptor (Raymond et al., 1999), which preferentially uncouples G $\beta\gamma$ over G α_i signaling (Wurch et al., 2003; Kushwaha et al., 2006). In contrast, activation of PKA leads to phosphorylation and desensitization of the 5-HT_{1A}-R with a stoichiometry of one phosphate per receptor (Raymond et al., 1999), and stimulation of PKA increases the PKC-induced phosphorylation and desensitization. The uncoupling of 5-HT_{1A}-Rs from G-proteins and from the inhibition of adenylyl cyclase was also associated to the actions of GRKs (Nebigil et al., 1995) since coexpression of GRK2 and β -arrestin2 triggered 5-HT_{1A}-R internalization via clathrin-coated pits (Heusler et al., 2008), and signaling to ERK1/2 (Della Rocca et al., 1999). The recruitment of β -arrestin2 to 5-HT_{1A}-Rs has been confirmed using BRET (Stroth et al., 2015) and β -arrestin2 co-internalizes with 5-HT_{1A}-Rs upon agonist stimulation (Albert and Vahid-Ansari, 2019). We demonstrate, here, that the selective stimulation by 8-OH-DPAT or by 5-HT of 5-HT_{1A}-Rs expressed alone decreases their surface expression resulting from receptor internalization (**Fig. 10A**). Concerning 5-HT_{2B}-Rs, our previous work indicated that the internalization of 5-HT_{2B}-Rs was dependent on clathrin and β -arrestin-2, but independent of Caveolin-1 (Cav1) and GRK2,3 when stimulated by 5-HT (Janoshazi et al., 2007), whereas stimulation by BW internalized 5-HT_{2B}-Rs more than twice faster than 5-HT and relied on GRK2,3, clathrin, and β -arrestin2, independently of Cav1. We demonstrate, here, that the selective stimulation by BW of 5-HT_{2B}-Rs expressed alone

decreases their cluster number and increases their density per cluster, whereas 5-HT has little effect (**Fig. 10A**). Similar transduction mechanisms likely take place in 5-HT neurons but remain to be documented.

Oligomerization is an important process for GPCRs and can be essential for their trafficking to the plasma membrane, agonist binding, G-protein activation and signaling (Herrick-Davis, 2013; Faron-Górecka et al., 2019). 5-HT-Rs are able to form homodimers or heterodimers with other 5-HT-Rs or non-5-HT-Rs (Maroteaux et al., 2019). 5-HT_{1A}-R/5-HT₇-R heterodimerization decreases G α i activation and inhibits GIRK activation, which are both mediated by 5-HT_{1A}-Rs without affecting the 5-HT₇-R signaling (Renner et al., 2012). 5-HT_{1A}-Rs and 5-HT_{2A}-Rs (close relative to 5-HT_{2B}-Rs) can form oligomers (Borroto-Escuela et al., 2017), and in pyramidal neurons of the prefrontal cortex, the coexpression of these two receptors triggers opposite and mixed effects of excitation/inhibition (Avesar and Gullledge, 2012; Ju et al., 2020). In cells coexpressing 5-HT_{1B}-Rs (close relative to 5-HT_{1A}-Rs) and 5-HT_{2B}-Rs, and in the absence of direct interaction, their co-stimulation by 5-HT makes 5-HT_{2B}-R to internalize via its classic clathrin pathways but also via 5-HT_{1B}-triggered GRK activation and Caveolin1-dependent pathways (Janoshazi et al., 2007). Here, we show that coexpression of 5-HT_{1A}-Rs and 5-HT_{2B}-Rs, even if their interaction has no apparent impact on their classical second messenger signalization, has an effect on the expression levels of both receptors at the plasma membrane (**Fig. 10B**). The specific interacting sequence in the heteromer between the 5-HT_{2B}-R and the 5-HT_{1A}-R has now to be identified.

We previously reported that injection of BW *in-vivo* attenuated the 5-HT_{1A}-R-dependent 8-OH-DPAT-induced hypothermia and the firing inhibition of 5-HT neurons, both of which being attributed to the action of 5-HT_{1A} autoreceptors on 5-HT neurons. These data supported that the 5-HT_{2B}-R was able to counteract 5-HT_{1A}-R negative effects (Belmer et al., 2018). Moreover, in the present study, we reveal that both receptors are expressed in the same neuronal somatodendritic compartment of raphe 5-HT neurons and that they physically and functionally interact. One important function of 5-HT_{1A}-Rs is the activation of GIRK channels, which leads to hyperpolarization and reduction of 5-HT neuron firing (Lüscher et al., 1997; Llamosas et al., 2015; Montalbano et al., 2015). The 5-HT_{1A}-R/5-HT_{2B}-R interaction could thus modify G $\beta\gamma$ -dependent outcomes. It has been shown that the G $\beta\gamma$ -dependent activation of GIRK channels relies on the promiscuous presence of PIP2 (Niu et al., 2020). However, the activation of 5-HT_{2B}-R promotes IP production through activation of PLC (Maroteaux, 2021). Since these two receptors interact within the same membrane microdomain, the activation of 5-HT_{2B}-R could prevent 5-HT_{1A}-R signal transduction cascade to GIRKs. This hypothesis could explain the previously mentioned *in-vivo* observations about hypothermia and firing (Belmer et al., 2018). Although the mechanism underlying the modulation of 5-HT neuron activity by 5-HT_{2B}-R remains to be clarified, the present study provides initial insight into the regulation of 5-HT_{1A}-R surface expression by 5-HT_{2B}-R through their interactions as dimers specifically in 5-HT neurons, thereby modulating serotonergic neuron activity.

We further show that the coexpression of 5-HT_{1A}-Rs with 5-HT_{2B}-Rs mimics the clustering effect of 5-HT_{2B}-R stimulation, and is enhanced by selective 5-HT_{1A}-R stimulation with 8-OH-DPAT. Thus, expression of 5-HT_{1A}-Rs without or with stimulation by 8-OH-DPAT can control 5-HT_{2B}-Rs clustering. Reciprocally, while homologous 5-HT_{1A}-R agonist stimulation by 8-OH-DPAT decreases 5-HT_{1A}-R surface expression, coexpression with the 5-HT_{2B}-R increases 5-HT_{1A}-R expression and maintains 5-HT_{1A}-R at the neuronal surface despite its own stimulation by 8-OH-DPAT (**Fig. 10B**). Therefore, the dynamic regulation of the 5-HT_{1A}-R surface expression not only depends on the ligand but also on cell types and their receptor expression. In addition, we show that 5-HT, the physiological ligand of 5-HT_{1A}-Rs and 5-HT_{2B}-Rs, has no significant impact on the distribution of 5-HT_{2B}-Rs coexpressed with 5-HT_{1A}-Rs. Interestingly, we found that 5-HT stimulation abolishes the 5-HT_{2B}-R positive

effect on 5-HT_{1A}-R surface expression, and decreases the 5-HT_{1A}-R surface expression level. This decrease was entirely 5-HT_{2B}-R-dependent since it can be restored by applying the 5-HT_{2B}-R antagonist RS, coherent with the observation that BW reduces 5-HT_{1A}-R surface expression only in the presence of 5-HT_{2B}-Rs. Together, these results demonstrate that the modulation of 5-HT_{1A}-R surface expression can be triggered not only by its own stimulation, but also through 5-HT_{2B}-R activation, confirming the crosstalk and explaining, at least in part, the *in vivo* interaction observed between these two receptors. The difference between the effects of 5-HT_{2B}-R stimulation by 5-HT and BW may be explained by its biased coupling to GRK2,3 that we previously reported (Janoshazi et al., 2007). We finally confirmed the lower efficacy of 5-HT, which had no obvious clustering or internalization effect on 5-HT_{2B}-Rs in the presence of 5-HT_{1A}-Rs (**Fig. 10B**).

We previously showed by cell-attached electrophysiological recording that activation of the 5-HT_{2B}-R by BW did increase 5-HT neurons firing activity (Belmer et al., 2018). Here, using current-clamp *ex-vivo* in identified 5-HT neurons, we observed that the increase in firing frequency of action potentials upon current steps was similar in cWT mice as in cKO^{5-HT} mice. Surprisingly, stimulation by 8-OH-DPAT increased significantly more the firing frequency of 5-HT neurons in the absence of 5-HT_{2B}-Rs in cKO^{5-HT} mice than in 5-HT neurons from cWT mice, i.e. in the presence of 5-HT_{2B}-Rs and 5-HT_{1A}-Rs. Only the inhibition of SK channels with apamin allowed the 5-HT neurons from cWT mice to fire as 5-HT neurons from cKO^{5-HT} mice. We can, therefore, propose that 5-HT_{2B}-Rs somehow compete with 5-HT_{1A}-Rs to inhibit SK channels. Previously, we showed using current-clamp recordings that 5-HT neuron overexpressing 5-HT_{2B}-Rs presented a significant increase in the basal (non-stimulated) firing frequency, compared to controls (Belmer et al., 2018). Interestingly, apamin was shown to increase the burst firing of DR 5-HT neurons leading to increased 5-HT release (Crespi, 2009) in a similar way as the SSRI fluoxetine (Crespi, 2010) or as the 5-HT_{2B}-R agonist BW (Diaz et al., 2012; Belmer et al., 2018). Furthermore, mice exposed to chronic social isolation develop depressive-like state that can be reversed by SSRIs only in the presence of 5-HT_{2B}-Rs (Diaz et al., 2016), or by apamin, which regulates 5-HT firing pattern (Sargin et al., 2016). Therefore, the interaction between 5-HT_{2B}-R/5-HT_{1A}-R and their stoichiometry are required to control proper firing of 5-HT neurons by regulating mAHP.

These results support our findings on 5-HT_{1A}-R/5-HT_{2B}-R interactions. The coexpression of 5-HT_{1A}-Rs with 5-HT_{2B}-Rs increases 5-HT_{1A}-R membrane expression by blocking its internalization by 8-OH-DPAT and also prevents 5-HT_{1A}-R coupling to inhibition of SK channels but favors its activation of GIRK channels. Here, only the exposure to 8-OH-DPAT together with apamin is able to trigger in cWT neurons a firing response similar to that of cKO^{5-HT} neurons, supporting the loss of ability of 5-HT_{1A}-Rs to couple to SK channels in the presence of 5-HT_{2B}-Rs. Our previous report that either 5-HT_{2B}-R overexpression or its stimulation by BW was able to increase 5-HT neuron firing (Belmer et al., 2018) together with the present observation that coexpression with 5-HT_{1A}-Rs increases the size of 5-HT_{2B}-R clusters potentiated by 8-OH-DPAT, supports 5-HT_{2B}-R ability to couple to SK channel inhibition. By contrast, in the absence of 5-HT_{2B}-Rs, 8-OH-DPAT triggers internalization of 5-HT_{1A}-Rs, and favors its coupling to SK inhibition (**Fig. 10C**) as previously reported (Grunnet et al., 2004).

Together, these data support that the ratio between 5-HT_{1A}-R and 5-HT_{2B}-R expression tunes the firing pattern of 5-HT neurons through SK and GIRK channels regulation and thus conditions the SSRI efficacy. It remains to be determined if 5-HT_{2B}-R stimulation controls directly (e.g. by PKC stimulation and thus by phosphorylation) SK channels, or if this regulation is relying exclusively on 5-HT_{1A}-R/5-HT_{2B}-R dimeric interactions and competition to common effectors.

REFERENCES

- Albert PR, Vahid-Ansari F (2019) The 5-HT_{1A} receptor: Signaling to behavior. *Biochimie* 161:34-45.
- Andrade R, Huereca D, Lyons JG, Andrade EM, Mcgregor KM (2015) 5-HT_{1A} Receptor-Mediated Autoinhibition and the Control of Serotonergic Cell Firing. *ACS Chem Neurosci* 6:1110-1115.
- Arango V, Huang Y-Y, Underwood MD, Mann JJ (2003) Genetics of the serotonergic system in suicidal behavior. *J Psy Res* 37:375-386.
- Avesar D, Gullledge AT (2012) Selective serotonergic excitation of callosal projection neurons. *Frontiers in neural circuits* 6:12.
- Belmer A, Quentin E, Diaz SL, Guiard BP, Fernandez SP, Doly S, Banas SM, Pitychoutis PM, Moutkine I, Muzerelle A, Tchenio A, Roumier A, Mameli M, Maroteaux L (2018) Positive regulation of raphe serotonin neurons by serotonin 2B receptors. *Neuropsychopharmacology* 43:1623–1632.
- Benhadda A, Quentin E, Moutkine I, Chanrion B, Russeau M, Marin P, Levi S, Maroteaux L (2021) Serotonin 2B Receptor by Interacting with NMDA Receptor and CIPP Protein Complex May Control Structural Plasticity at Glutamatergic Synapses. *ACS Chem Neurosci* 12:1133-1149.
- Bevilacqua L, Doly S, Kaprio J, Yuan Q, Tikkanen R, Paunio T, Zhou Z, Wedenoja J, Maroteaux L, Diaz S, Belmer A, Hodgkinson C, Dell'Osso L, Suvisaari J, Coccaro E, Rose R, Peltonen L, Virkkunen M, Goldman D (2010) A population-specific HTR2B stop codon predisposes to severe impulsivity. *Nature* 468:1061-1066.
- Borroto-Escuela DO, Li X, Tarakanov AO, Savelli D, Narváez M, Shumilov K, Andrade-Talavera Y, Jimenez-Beristain A, Pomierny B, Díaz-Cabiale Z, Cuppini R, Ambrogini P, Lindskog M, Fuxe K (2017) Existence of brain 5-HT_{1A}-5-HT_{2A} isoreceptor complexes with antagonistic allosteric receptor-receptor interactions regulating 5-HT_{1A} receptor recognition. *ACS Omega* 2:4779-4789.
- Bouaziz E, Emerit MB, Vodjdani G, Gautheron V, Hamon M, Darmon M, Masson J (2014) Neuronal phenotype dependency of agonist-induced internalization of the 5-HT_{1A} serotonin receptor. *J Neurosci* 34:282-294.
- Courtney NA, Ford CP (2016) Mechanisms of 5-HT_{1A} receptor-mediated transmission in dorsal raphe serotonin neurons. *J Physiol* 594:953-965.
- Crespi F (2009) Apamin increases 5-HT cell firing in raphe dorsalis and extracellular 5-HT levels in amygdala: a concomitant in vivo study in anesthetized rats. *Brain Research* 1281:35-46.
- Crespi F (2010) SK channel blocker apamin attenuates the effect of SSRI fluoxetine upon cell firing in dorsal raphe nucleus: a concomitant electrophysiological and electrochemical in vivo study reveals implications for modulating extracellular 5-HT. *Brain Research* 1334:1-11.
- Della Rocca GJ, Maudsley S, Daaka Y, Lefkowitz RJ, Luttrell LM (1999) Pleiotropic coupling of G protein-coupled receptors to the mitogen- activated protein kinase cascade. Role Of focal adhesions and receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 274:13978-13984.
- Diaz SL, Narboux-Nême N, Boutourlinsky K, Doly S, Maroteaux L (2016) Mice lacking the serotonin 5-HT_{2B} receptor as an animal model of resistance to selective serotonin reuptake inhibitors antidepressants. *Eur Neuropsychopharmacol* 26:265-279.
- Diaz SL, Doly S, Narboux-Nême N, Fernandez S, Mazot P, Banas S, Boutourlinsky K, Moutkine I, Belmer A, Roumier A, Maroteaux L (2012) 5-HT_{2B} receptors are required for serotonin-selective antidepressant actions. *Mol Psychiatry* 17:154-163.
- Doly S, Quentin E, Eddine R, Tolu S, Fernandez S, Bertran-Gonzalez J, Valjent E, Belmer A, Viñals X, Callebert J, Faure P, Meye F, Hervé D, Robledo P, Mameli M, Launay J, Maldonado R, Maroteaux L (2017) Serotonin 2B receptors in mesoaccumbens dopamine pathway regulate cocaine responses. *J Neurosci* 37:10372-10388.
- Faron-Górecka A, Szlachta M, Kolasa M, Solich J, Górecki A, Kuśmider M, Żurawek D, Dziejzicka-Wasylewska M (2019) Understanding GPCR dimerization. In: *Receptor-Receptor Interactions*, pp 155-178.
- Garcia-Garcia AL, Newman-Tancredi A, Leonardo ED (2014) 5-HT_{1A} receptors in mood and anxiety: recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function. *Psychopharmacology* 231:623-636.
- Grunnet M, Jespersen T, Perrier J-F (2004) 5-HT_{1A} receptors modulate small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *J Neurosci Res* 78:845-854.

- Herrick-Davis K (2013) Functional significance of serotonin receptor dimerization. *Exp Br Res* 230:375-386.
- Heusler P, Newman-Tancredi A, Loock T, Cussac D (2008) Antipsychotics differ in their ability to internalise human dopamine D2S and human serotonin 5-HT1A receptors in HEK293 cells. *Eur J Pharmacol* 581:37-46.
- Heusler P, Pauwels PJ, Wurch T, Newman-Tancredi A, Tytgat J, Colpaert FC, Cussac D (2005) Differential ion current activation by human 5-HT(1A) receptors in *Xenopus* oocytes: evidence for agonist-directed trafficking of receptor signalling. *Neuropharmacology* 49:963-976.
- Jacobsen JPR, Weikop P, Hansen HH, Mikkelsen JD, Redrobe JP, Holst D, Bond CT, Adelman JP, Christophersen P, Mirza NR (2008) SK3 K⁺ channel-deficient mice have enhanced dopamine and serotonin release and altered emotional behaviors. *Genes, brain, and behavior* 7:836-848.
- Janoshazi A, Deraet M, Callebert J, Setola V, Guenther S, Saubamea B, Manivet P, Launay JM, Maroteaux L (2007) Modified receptor internalization upon co-expression of 5-HT1B receptor and 5-HT2B receptors. *Mol Pharmacol* 71:1463-1474.
- Ji H, Hougaard C, Herrik KF, Strøbaek D, Christophersen P, Shepard PD (2009) Tuning the excitability of midbrain dopamine neurons by modulating the Ca²⁺ sensitivity of SK channels. *Eur J Neurosci* 29:1883-1895.
- Ju A, Fernandez-Arroyo B, Wu Y, Jacky D, Beyeler A (2020) Expression of serotonin 1A and 2A receptors in molecular- and projection-defined neurons of the mouse insular cortex. *Molecular Brain* 13:99.
- Kia HK, Miquel MC, Brisorgueil MJ, Daval G, Riad M, el Mestikawy S, Hamon M, Vergé D (1996) Immunocytochemical localization of serotonin1A receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 365:289-305.
- Kidd EJ, Garratt JC, Marsden CA (1991) Effects of repeated treatment with 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (DOI) on the autoregulatory control of dorsal raphe 5-HT neuronal firing and cortical 5-HT release. *Eur J Pharmacol* 200:131-139.
- Kirby LG, Pernar L, Valentino RJ, Beck SG (2003) Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. *Neuroscience* 116:669-683.
- Kushwaha N, Harwood SC, Wilson AM, Berger M, Tecott LH, Roth BL, Albert PR (2006) Molecular determinants in the second intracellular loop of the 5-hydroxytryptamine-1A receptor for G-protein coupling. *Molecular Pharmacology* 69:1518-1526.
- Lin SL, Setya S, Johnson-Farley NN, Cowen DS (2002) Differential coupling of 5-HT(1) receptors to G proteins of the G(i) family. *Br J Pharmacol* 136:1072-1078.
- Liu X, Fuentes EJ (2019) Emerging Themes in PDZ Domain Signaling: Structure, Function, and Inhibition. *International Review of Cell and Molecular Biology* 343:129-218.
- Llamosas N, Bruzos-Cidón C, Rodríguez JJ, Ugedo L, Torrecilla M (2015) Deletion of GIRK2 Subunit of GIRK Channels Alters the 5-HT1A Receptor-Mediated Signaling and Results in a Depression-Resistant Behavior. *Int J Neuropsychopharmacol* 18:pyv051.
- Lüscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA (1997) G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* 19:687-695.
- MacDonald L, Baldini G, B. S (2015) Does Super-Resolution Fluorescence Microscopy Obsolete Previous Microscopic Approaches to Protein Co-localization? In: *Membrane Trafficking* (Tang BL, ed), pp 255-277: Springer.
- Mann JJ (1999) Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. *Neuropsychopharm* 21:99S-105S.
- Marazziti D (2017) Understanding the role of serotonin in psychiatric diseases. *F1000Research* 6:180.
- Maroteaux L (2021) Gene structure, expression, and 5-HT2B receptor signaling. In: *5-HT2B Receptors: From MolecularBiology to Clinical Applications*, Humana Press Edition (Maroteaux L, Monassier L, eds), pp 1-31.
- Maroteaux L, Béchade C, Roumier A (2019) Dimers of serotonin receptors: Impact on ligand affinity and signaling. *Biochimie* 161:22-33.
- McDevitt RA, Neumaier JF (2011) Regulation of dorsal raphe nucleus function by serotonin autoreceptors: a behavioral perspective. *J Chem Neuroanat* 41:234-246.

- Montalbano A, Corradetti R, Mlinar B (2015) Pharmacological Characterization of 5-HT_{1A} Autoreceptor-Coupled GIRK Channels in Rat Dorsal Raphe 5-HT Neurons. *PLoS One* 10:e0140369.
- Moutkine I, Quentin E, Guiard BP, Maroteaux L, Doly S (2017) Heterodimers of serotonin receptor subtypes 2 are driven by 5-HT_{2C} protomers. *J Biol Chem* 292:6352-6368.
- Muzerelle A, Scotto-Lomassese S, Bernard JF, Soiza-Reilly M, Gaspar P (2016) Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5-B9) to the forebrain and brainstem. *Br Struct Funct* 221:535-561.
- Nebigil CG, Garnovskaya MN, Casanas SJ, Mulheron JG, Parker EM, Gettys TW, Raymond JR (1995) Agonist-induced desensitization and phosphorylation of human 5-HT_{1A} receptor expressed in Sf9 insect cells. *Biochemistry* 34:11954-11962.
- Niederkofler V, Asher TE, Okaty BW, Rood BD, Narayan A, Hwa LS, Beck SG, Miczek KA, Dymecki SM (2016) Identification of Serotonergic Neuronal Modules that Affect Aggressive Behavior. *Cell Reports* 17:1934-1949.
- Niu Y, Tao X, Touhara KK, MacKinnon R (2020) Cryo-EM analysis of PIP₂ regulation in mammalian GIRK channels. *eLife* 9:1-18.
- Okaty BW, Sturrock N, Escobedo Lozoya Y, Chang Y, Senft RA, Lyon KA, Alekseyenko OV, Dymecki SM (2020) A single-cell transcriptomic and anatomic atlas of mouse dorsal raphe Pet1 neurons. *eLife* 9.
- Percie du Sert N et al. (2020) The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS biology* 18:e3000410.
- Raymond JR, Mukhin YV, Gettys TW, Garnovskaya MN (1999) The recombinant 5-HT_{1A} receptor: G protein coupling and signalling pathways. *Brit J Pharmacol* 127:1751-1764.
- Renner U, Zeug A, Woehler A, Niebert M, Dityatev A, Dityateva G, Gorinski N, Guseva D, Abdel-Galil D, Frohlich M, Doring F, Wischmeyer E, Richter DW, Neher E, Ponimaskin EG (2012) Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT_{1A} and 5-HT₇ differentially regulates receptor signalling and trafficking. *J Cell Science* 125:2486-2499.
- Riad M, Watkins KC, Doucet E, Hamon M, Descarries L (2001) Agonist-induced internalization of serotonin-1a receptors in the dorsal raphe nucleus (autoreceptors) but not hippocampus (heteroreceptors). *J Neurosci* 21:8378-8386.
- Riad M, Garcia S, Watkins KC, Jodoin N, Doucet E, Langlois X, el Mestikawy S, Hamon M, Descarries L (2000) Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol* 417:181-194.
- Rouchet N, Waroux O, Lamy C, Massotte L, Scuvée-Moreau J, Liégeois J-F, Seutin V (2008) SK channel blockade promotes burst firing in dorsal raphe serotonergic neurons. *Eur J Neurosci* 28:1108-1115.
- Sargin D, Oliver DK, Lambe EK (2016) Chronic social isolation reduces 5-HT neuronal activity via upregulated SK3 calcium-activated potassium channels. *eLife* 5:e21416.
- Scott MM, Wylie CJ, Lerch JK, Murphy R, Lobur K, Herlitze S, Jiang W, Conlon RA, Strowbridge BW, Deneris ES (2005) A genetic approach to access serotonin neurons for in vivo and in vitro studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16472-16477.
- Specht CG, Izeddin I, Rodriguez PC, El Beheiry M, Rostaing P, Darzacq X, Dahan M, Triller A (2013) Quantitative nanoscopy of inhibitory synapses: counting gephyrin molecules and receptor binding sites. *Neuron* 79:308-321.
- Stroth N, Niso M, Colabufo NA, Perrone R, Svenningsson P, Lacivita E, Leopoldo M (2015) Arylpiperazine agonists of the serotonin 5-HT_{1A} receptor preferentially activate cAMP signaling versus recruitment of β -arrestin-2. *Bioorg Med Chem* 23:4824-4830.
- Tikkanen R, Tiihonen J, Rautiainen MR, Paunio T, Bevilacqua L, Panarsky R, Goldman D, Virkkunen M (2015) Impulsive alcohol-related risk-behavior and emotional dysregulation among individuals with a serotonin 2B receptor stop codon. *Transl Psychiatry* 5:e681.
- Valdizán EM, Castro E, Pazos A (2010) Agonist-dependent modulation of G-protein coupling and transduction of 5-HT_{1A} receptors in rat dorsal raphe nucleus. *Int J Neuropsychopharmacol* 13:835-843.
- Wurch T, Colpaert FC, Pauwels PJ (2003) Mutation in a protein kinase C phosphorylation site of the 5-HT_{1A} receptor preferentially attenuates Ca²⁺ responses to partial as opposed to higher-efficacy 5-HT_{1A} agonists. *Neuropharmacology* 44:873-881.

FIGURES

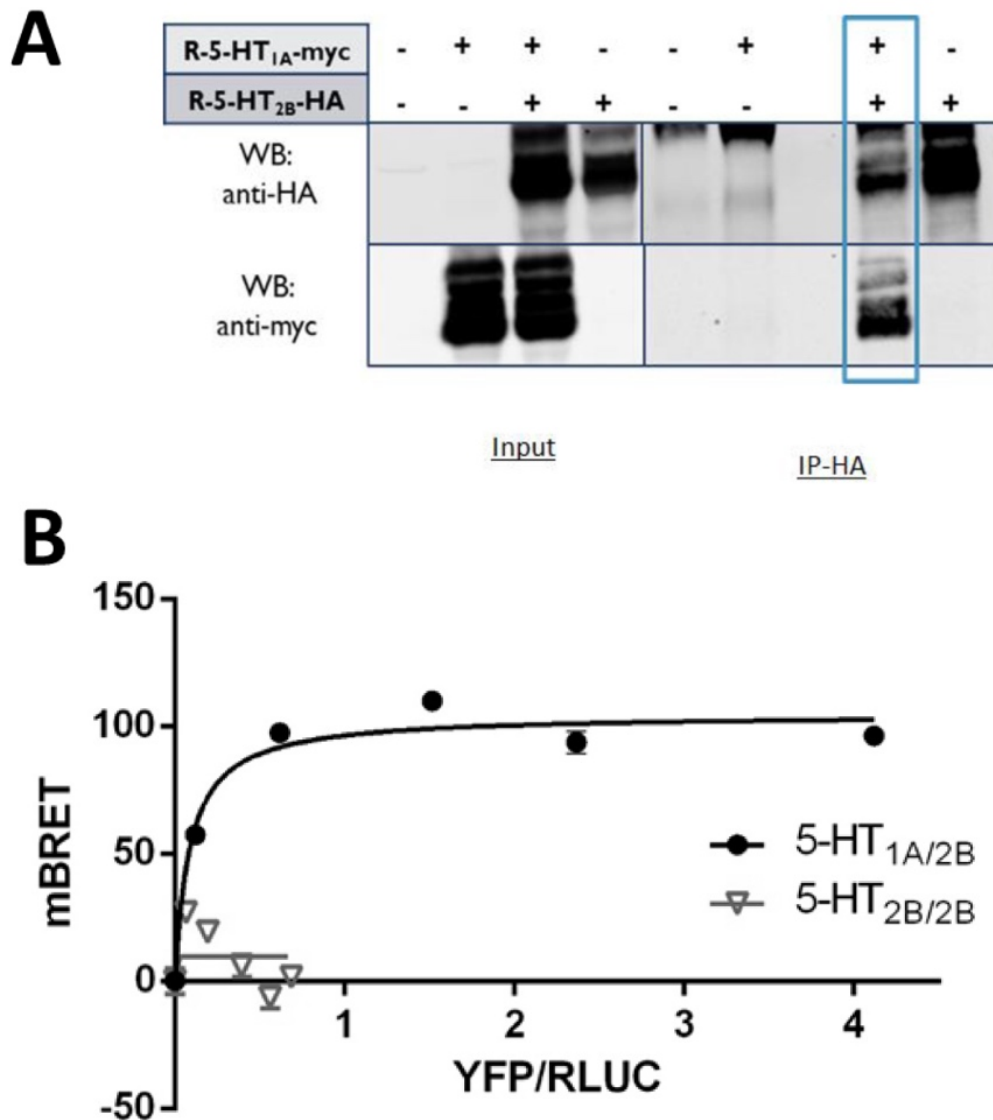


Figure 1: Physical proximity of 5-HT_{2B}-Rs and 5-HT_{1A}-Rs in transfected cells. (A) Co-immunoprecipitation of 5-HT_{1A}-Rs coexpressed with the 5-HT_{2B}-Rs in COS-7 cells. Proteins from COS-7 cells co-transfected with plasmids coding for HA-tagged 5-HT_{2B} (R-5-HT_{2B}-HA) and myc-tagged 5-HT_{1A} (R-5-HT_{1A}-myc) receptors were immunoprecipitated and analyzed by Western blotting. Blot of input of proteins revealed by anti-myc antiserum (WB anti-myc) or by anti-HA antiserum (WB anti-HA) shows the presence of the proteins in each condition (Input; left panel). Immunoprecipitations using anti-HA beads (IP-HA; right panel) revealed a co-immunoprecipitation between 5-HT_{1A}-Rs and 5-HT_{2B}-Rs. (B) BRET proximity assays for 5-HT_{1A}-Rs and 5-HT_{2B}-Rs. COS-7 cells were co-transfected with a constant amount of plasmids coding for RLuc-5-HT_{2B}-R (BRET donor) and increasing amount of plasmid encoding YFP-tagged 5-HT_{1A}-R (BRET acceptors) or YFP-tagged 5-HT_{2B}-R as control unable to form dimers (Moutkine et al., 2017). The hyperbolic curve attests close interaction between 5-HT_{1A}-YFP and 5-HT_{2B}-RLuc with a physical distance <10 nm (representative experiment of n > 3 independent experiments).

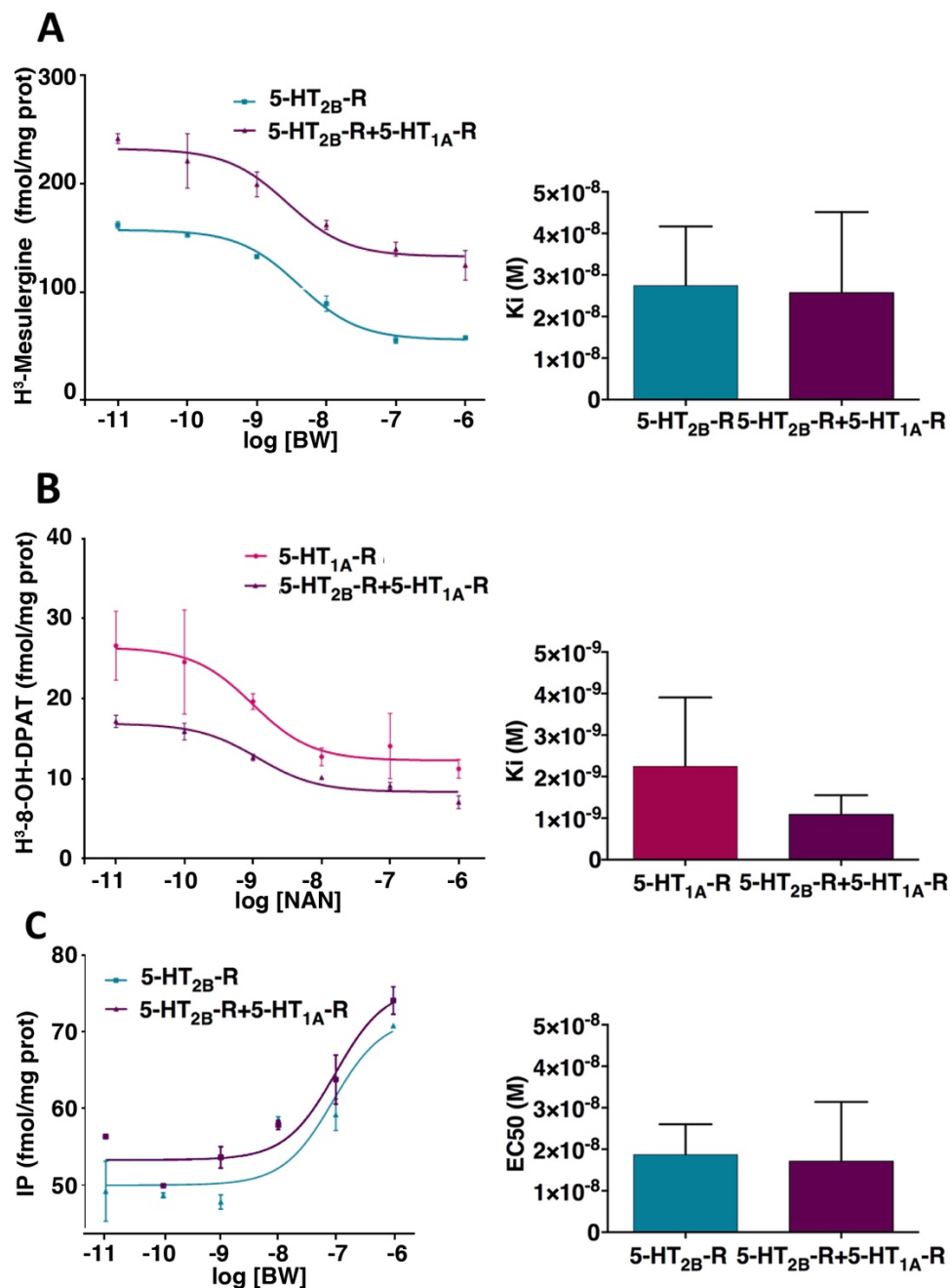


Figure 2: Receptor expression and second messenger signaling are not affected by 5-HT_{2B}-R /5-HT_{1A}-R dimerization. Radioligand binding competition by BW or NAN of tritiated-mesulergine (A) or 8-OH-DPAT (B) performed on total membrane proteins from transfected COS-7 cells expressing 5-HT_{2B}-Rs with or without 5-HT_{1A}-R. No effect was found in the coexpression condition regarding the total receptor expression (Bmax) or their binding affinity to their respective ligand (Ki) (Right). Data were analyzed using the Mann-Whitney unpaired t-test. Representative curves of n = 3 independent experiments, each performed in duplicate. (C) Impact of coexpression on 5-HT_{2B}-R and 5-HT_{1A}-R-operated signal transduction. The quantification of inositol phosphate was performed in COS-7 cells expressing 5-HT_{2B}-Rs with or without 5-HT_{1A}-Rs and stimulated with increasing concentrations of the 5-HT_{2B}-R agonist BW. Note the absence of effect, in the coexpression condition, on IP production compared to the single 5-HT_{2B}-R expression condition. Data were statistically analyzed by Mann-Whitney unpaired t-test. Representative curves of n = 3 independent experiments, each performed in duplicate.

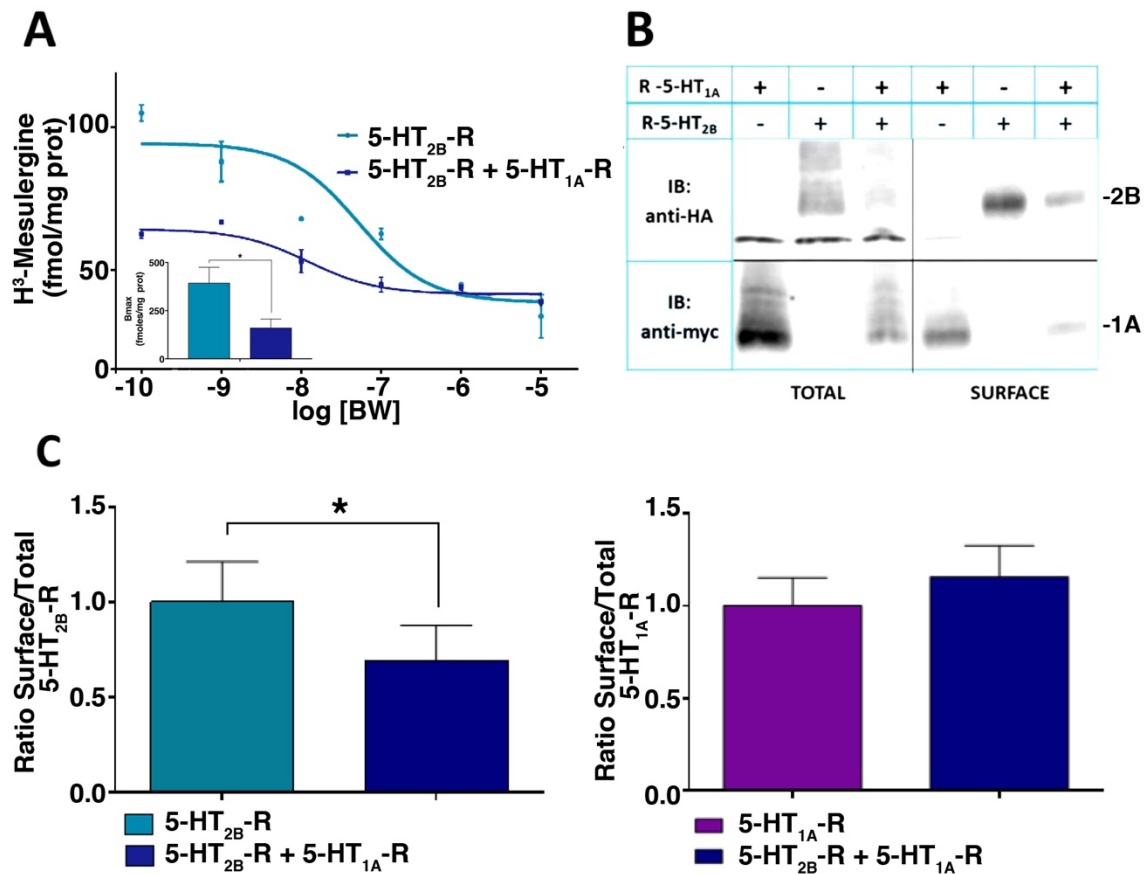


Figure 3: 5-HT_{2B}-R /5-HT_{1A}-R co-expression decreases 5-HT_{2B}-R surface expression. (A). Radioligand binding competition by BW of tritiated mesulergine performed on surface proteins (intact cells) from transfected COS-7 cells expressing 5-HT_{2B}-Rs with or without 5-HT_{1A}-Rs. Co-expression revealed a decreased surface expression of the 5-HT_{2B}-R illustrated by a significant decrease in B_{max} (p=0.037; inset). Data were analyzed using unpaired t-test with Welch's correction; n = 3 independent experiments, each performed in duplicate. **(B-C).** Surface biotinylation performed on COS-7 cells expressing 5-HT_{1A}-Rs and/or 5-HT_{2B}-Rs. **(B)** Analysis by Western blotting. **(C).** Ratio of the surface/total protein expression for each receptor analyzed in conditions of simple transfection or in co-expression experiments. Co-expression of the two receptors confirmed the decrease in 5-HT_{2B}-R (unpaired t-test p=0.0474, n = 5) but not 5-HT_{1A}-R surface expression (unpaired t-test p=0.4596, n=5). Representative curves of n = 5 independent experiments, each performed in duplicate. Band intensity of each condition was quantified and represented graphically (*p<0,05).

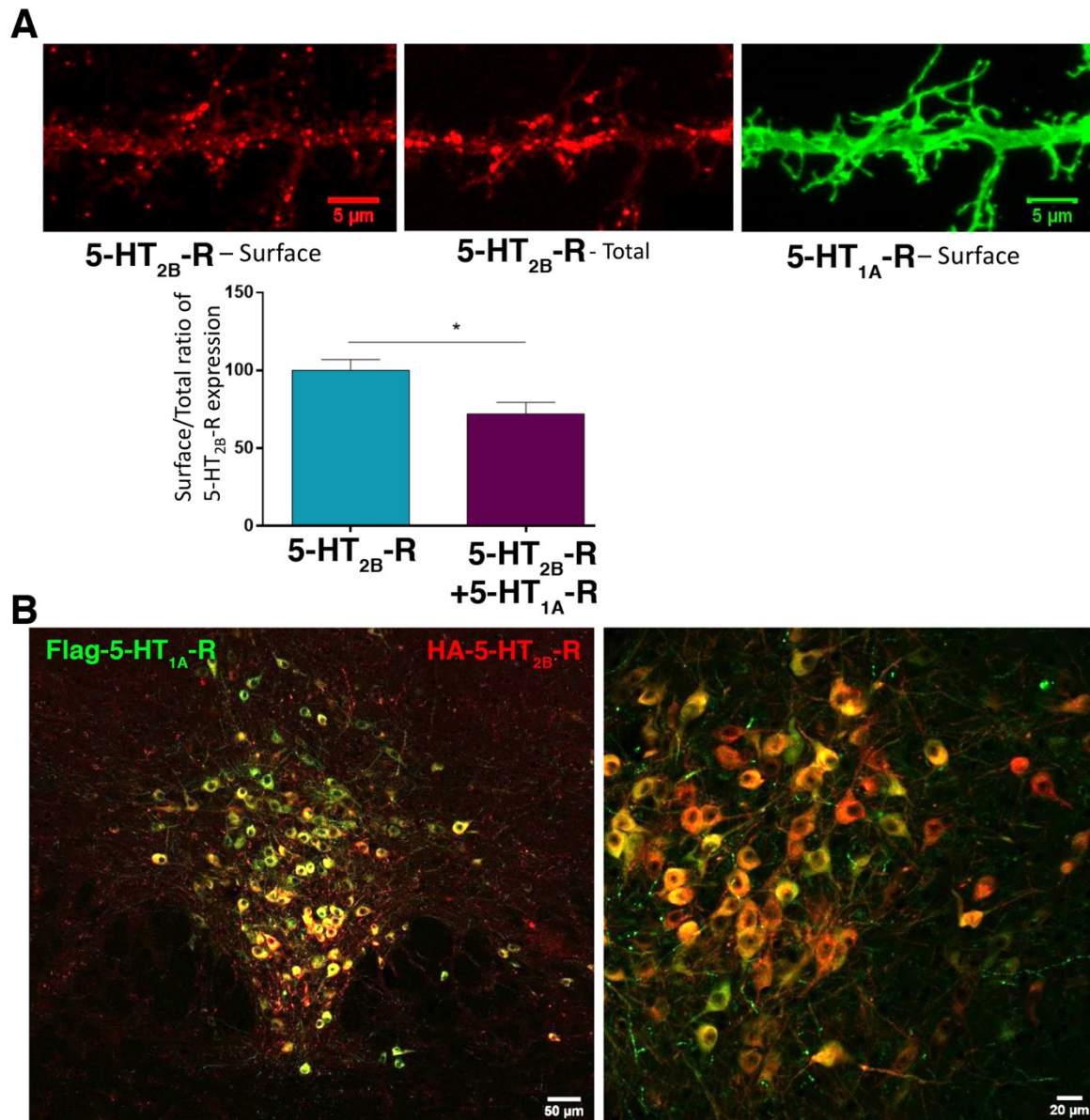


Figure 4: Co-expression of 5-HT_{2B}-Rs with 5-HT_{1A}-Rs in hippocampal and raphe neurons. (A). 5-HT_{2B}-R localization by HA-tag immunostaining revealed receptor clustering (red) at the dendritic surface of hippocampal neurons, whereas the 5-HT_{1A}-R localization studied using myc-tag immunostaining reported a more even distribution (green) of 5-HT_{1A}-R. Furthermore, a staining in the absence of detergent (surface expression) or in the presence of detergent (total expression) indicated that co-expressing 5-HT_{1A}-Rs with 5-HT_{2B}-R decreased the surface/total ratio of 5-HT_{2B}-R. ($p=0.011$, as assessed by unpaired t-test; $n=3$ independent experiments; Scale bars, 5 μm). (B). Mouse brains were examined to assess the distribution of adeno-associated virus-encoded DIO Flag-tagged 5-HT_{1A}-Rs and HA-tagged 5-HT_{2B}-Rs injected specifically in B7 raphe 5-HT neurons of *Pet1-Cre⁺⁰* mice. Images of 5-HT neurons labeled with Flag (green) and HA (red) antibodies is shown at increasing magnifications (from left to right) and reveals colocalization of both receptors in the somato-dendritic compartment. Scale bars, 50 and 20 μm , as indicated.

Figure 5: Co-expression of 5-HT_{2B}-R/5-HT_{1A}-R increases 5-HT_{2B}-R membrane clustering and maintains 5-HT_{1A}-R surface expression upon orthologous stimulation. (A). Top, 5-HT_{2B}-R clustering at the dendritic surface 0, 10 or 20 min after BW stimulation in the absence (top) or presence (bottom) of 5-HT_{1A}-R. Scale bars, 10 μ m. Bottom, Quantification of 5-HT_{2B}-R surface clustering following agonist stimulation in the presence (or not) of 5-HT_{1A}-Rs. Upon 5-HT_{2B}-R stimulation by BW (1 μ M), the number of 5-HT_{2B}-R clusters decreased in the absence of 5-HT_{1A}-Rs ($p=0.0026$ t0 vs. t10 and $p < 0.0001$ t0 vs. t20), as revealed by Kruskal-Wallis test, $P < 0.0001$, followed by Dunn's multiple comparisons test; in the presence of 5-HT_{1A}-Rs, the 5-HT_{2B}-R cluster number decreased in absence of BW stimulation and was unaffected by BW stimulation, $p=0.004$ t0 5-HT_{2B}-R vs. t0 5-HT_{1A}-R. The BW stimulation of 5-HT_{2B}-R alone increased the cluster size (area), $p=0.0016$ t0 vs. t10 and $p < 0.0001$ t0 vs. t20; in the presence of 5-HT_{1A}-R, the 5-HT_{2B}-R cluster area increased but was unaffected by BW stimulation, $p=0.0008$ t0 5-HT_{2B}-R vs. t0 5-HT_{1A}-R. The BW stimulation slightly increased the molecular density of clusters (integrated intensity) of 5-HT_{2B}-R clusters from 0 to 20 min in the absence of 5-HT_{1A}-Rs, $p=0.00007$ t0 vs. t20; in the presence of 5-HT_{1A}-Rs, the 5-HT_{2B}-R cluster integrated intensity was unaffected without or with BW stimulation. Number of cells = 19-38 from 3-4 experiments. **(B).** Top, 5-HT_{1A}-R expression at the dendritic surface 0, 10 or 20 min after 8-OH-DPAT stimulation in the absence (top) or presence (bottom) of 5-HT_{2B}-R. Scale bars, 10 μ m. Bottom, Quantification of 5-HT_{1A}-R surface expression following agonist stimulation in the presence (or not) of 5-HT_{2B}-R. Upon 5-HT_{1A}-R stimulation by 8-OH-DPAT (1 μ M), 5-HT_{1A}-R expression at the neuronal surface decreased from 0 to 10 min in the absence of 5-HT_{2B}-R compared to t0 as revealed by Kruskal-Wallis test, $P < 0.0001$, followed by Dunn's multiple comparisons test, $p=0.0115$ t0 vs. t10; in the presence of 5-HT_{2B}-Rs, the 5-HT_{1A}-R expression increased but was unaffected by 8-OH-DPAT stimulation, $p=0.0172$ t0 5-HT_{2B}-R vs. t0 5-HT_{1A}-R+5-HT_{2B}-R. Number of cells = 18-43 from 3 experiments. In all graphs, data, expressed as percentage of their respective values at t0. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

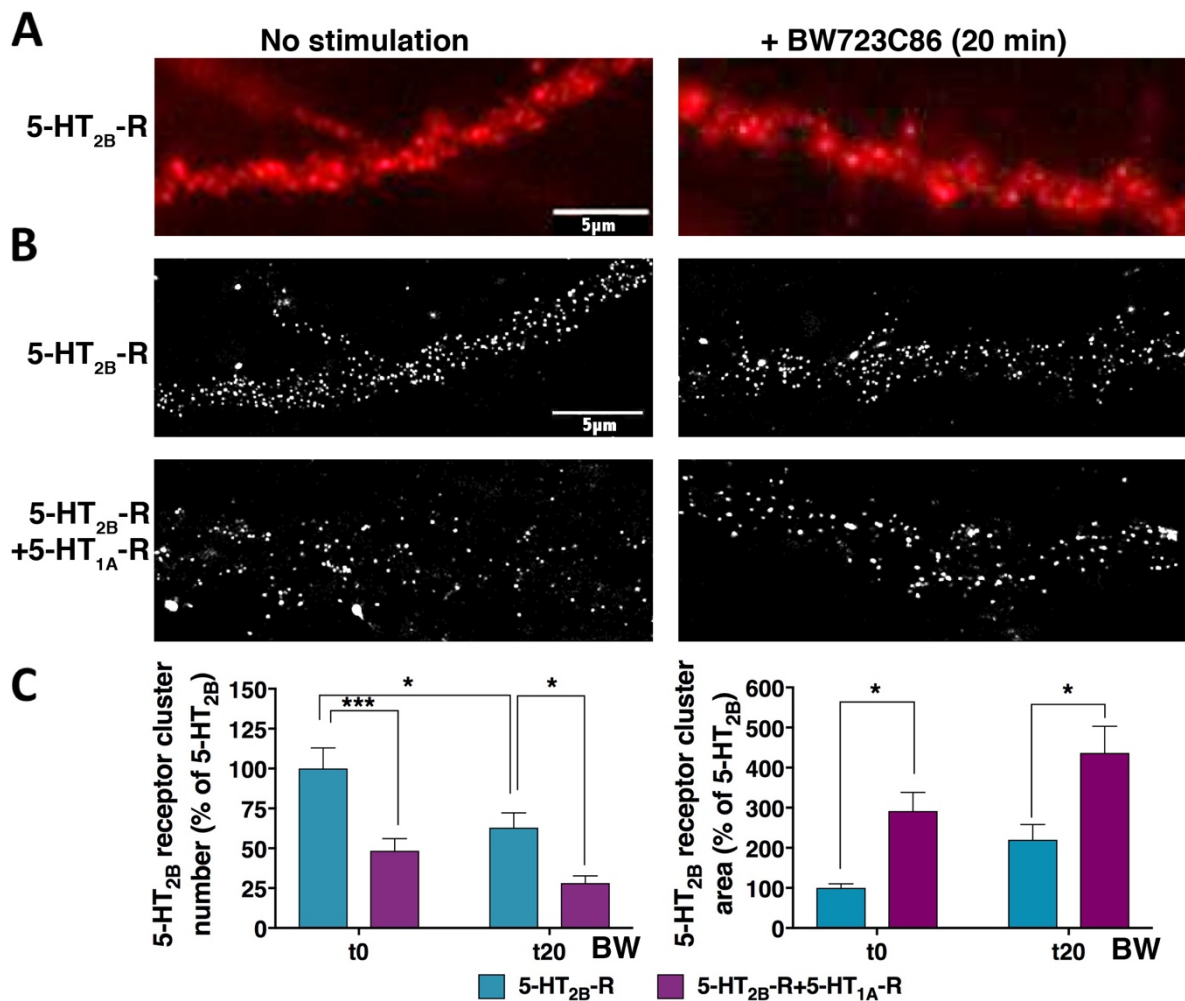


Figure 6: Super-resolution microscopy confirmed that the co-expression of 5-HT_{2B}-R with 5-HT_{1A}-R increases 5-HT_{2B}-R membrane clustering as upon BW agonist stimulation. (A). Images of 5-HT_{2B}-R membrane clusters acquired by epifluorescence microscopy. Note that clusters are not well-defined and diffuse compared to the lower images acquired at super resolution. Scale bar, 5 μm. (B). STORM images of 5-HT_{2B}-R obtained from the dendritic regions shown in A before (left panel) or 20 min (right panel) after BW stimulation in the absence (top) or presence (bottom) of 5-HT_{1A}-R. Scale bar, 5 μm. (C). Quantification of 5-HT_{2B}-R clustering following agonist stimulation in the presence or not of 5-HT_{1A}-R. The number of 5-HT_{2B}-R clusters was significantly decreased upon stimulation by BW (1 μM) or by co-expression with the 5-HT_{1A}-R. 2-way ANOVA revealed main effects of agonist treatment $F_{1,70} = 11.15$, $P=0.0014$ and receptor expression $F_{1,70} = 25.31$, $P<0.0001$; t0 5-HT_{2B}-R vs. t0 5-HT_{2B}-R+5-HT_{1A}-R $p=0.0004$; t20 5-HT_{2B}-R vs. t20 5-HT_{2B}-R+5-HT_{1A}-R $p=0.028$; t0 vs. t20 5-HT_{2B}-R, $p=0.0271$ by Tukey's multiple comparisons test. The area of 5-HT_{2B}-R clusters was significantly increased upon stimulation by BW for 20 min (t20) or by co-expression with the 5-HT_{1A}-R. 2-way ANOVA revealed main effects of agonist treatment $F_{1,70} = 7.067$, $P=0.0097$ and receptor expression $F_{1,70} = 16.78$, $P=0.0001$; t0 5-HT_{2B}-R vs. t0 5-HT_{2B}-R+5-HT_{1A}-R $p=0.0402$; t20 5-HT_{2B}-R vs. t20 5-HT_{2B}-R+5-HT_{1A}-R $p=0.0156$ by Tukey's multiple comparisons test. Number of cells = 16-21, from 3 experiments. Data are expressed as percentage of their respective values at t0. **** $p<0.0001$, *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$.

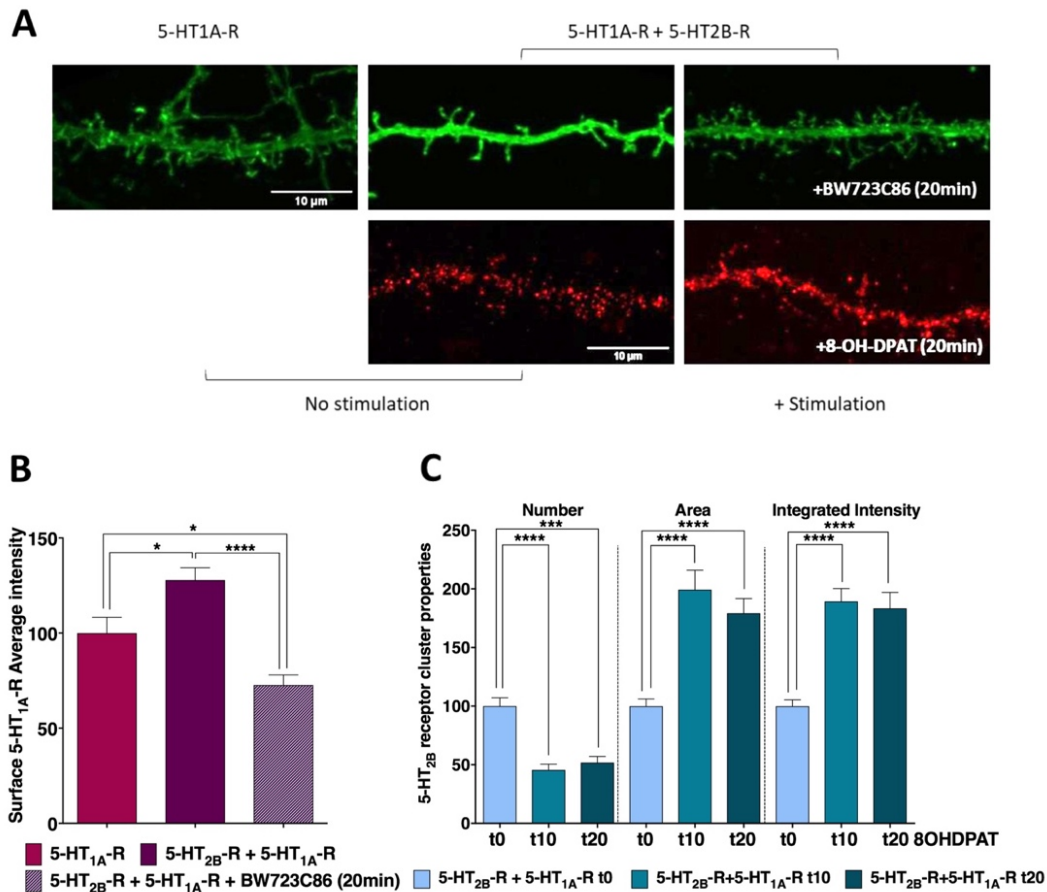


Figure 7: Effects of cross-stimulation of 5-HT_{2B}-Rs or 5-HT_{1A}-Rs on their respective surface expression. (A). Images of 5-HT_{1A}-R and 5-HT_{2B}-R surface expression acquired by confocal microscopy. Top, 5-HT_{1A}-R (green) at the dendritic surface in the absence (left) or presence of 5-HT_{2B}-Rs, and 0 (middle) or 20 min (right) after BW stimulation. Scale bar, 10 μm. Bottom, 5-HT_{2B}-R (red) clustering at the dendritic surface 0 (left) or 20 min (right) after 8-OH-DPAT stimulation in the presence of 5-HT_{1A}-Rs. Scale bar, 10 μm. **(B)** Quantification of 5-HT_{1A}-R surface expression in neurons expressing 5-HT_{1A}-R alone or in combination with 5-HT_{2B}-Rs, with or without 5-HT_{2B}-R stimulation by BW (1 μM). One-way ANOVA analysis shows a significant effect of the co-expression of 5-HT_{2B}-R $F_{2, 43} = 16.15$, $P < 0.0001$, with an increase in 5-HT_{1A}-R surface expression, as shown by Tukey's multiple comparison ($p = 0.0188$ vs. non-stimulated 5-HT_{1A}-R); the 5-HT_{2B}-R stimulation by BW in co-expression experiment abolishes this effect ($p < 0.0001$ vs. non-stimulated) and even reverses this effect ($p = 0.0463$) as compared to non-stimulated neurons expressing 5-HT_{1A}-R alone. Number of cells = 12-22, from 2 experiments. **(C)** Quantification of 5-HT_{2B}-R clustering in neurons co-expressing 5-HT_{1A}-R in control condition or after 10 or 20 min of 5-HT_{1A}-R stimulation with 8-OH-DPAT (1 μM). Upon stimulation by 8-OH-DPAT, the number of 5-HT_{2B}-R clusters decreased as revealed by Kruskal-Wallis test, $P < 0.0001$, followed by Dunn's multiple comparisons test; $p < 0.0001$ t0 vs. t10 and $p = 0.0001$ t0 vs. t20; and their area was increased, as revealed by Kruskal-Wallis test, $P < 0.0001$, followed by Dunn's multiple comparisons test, $p < 0.0001$, t0 vs. t10 and $p < 0.0001$ t0 vs. t20; their molecular density (integrated intensity) was also increased, as revealed by Kruskal-Wallis test, $P < 0.0001$, followed by Dunn's multiple comparisons test, $p < 0.0001$ t0 vs. t10 and $p < 0.0001$ t0 vs. t20. Data are expressed as percentage of their respective values at t0. Number of cells = 11-24 from 3 experiments. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

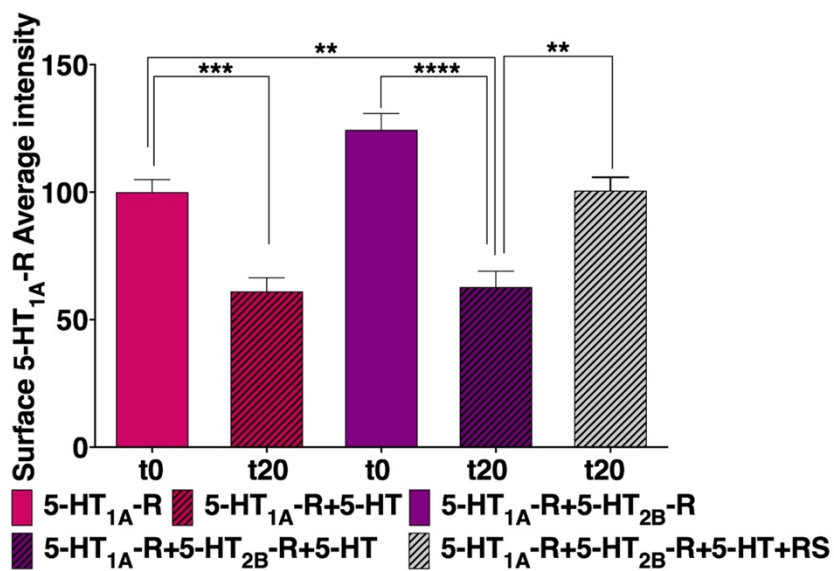
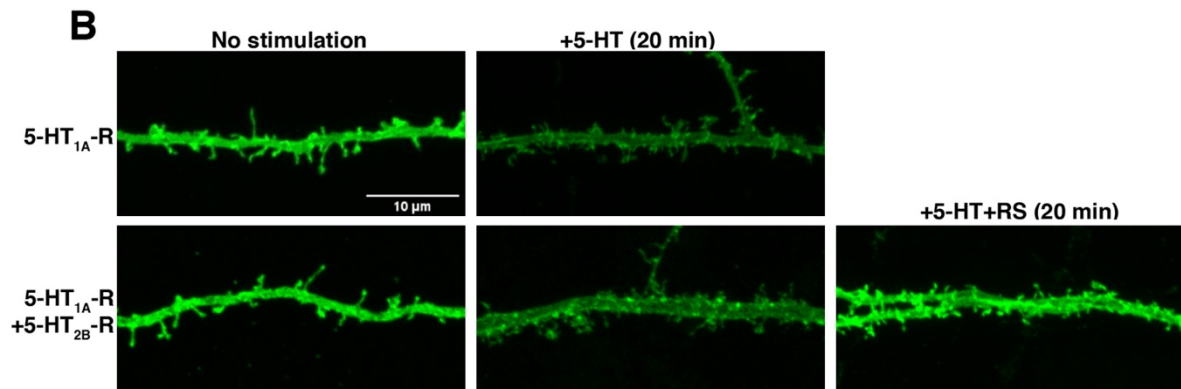
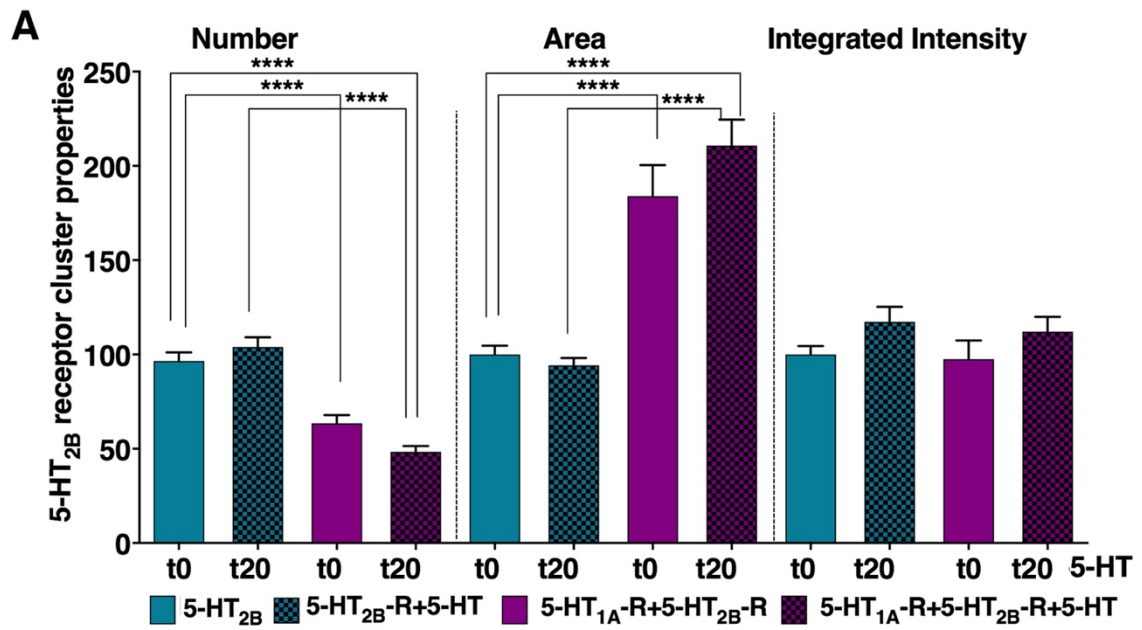


Figure 8: Effect of 5-HT stimulation of 5-HT_{1A}-R and 5-HT_{2B}-R expressed separately or in combination on their membrane expression and clustering. (A). Quantification of 5-HT_{2B}-R membrane clustering following 5-HT stimulation in the presence or not of 5-HT_{1A}-R. In the presence of 5-HT_{1A}-R, the number of 5-HT_{2B}-R clusters decreased as revealed by Kruskal-Wallis test, $P < 0.0001$, followed by Dunn's multiple comparisons test; $p < 0.0001$, t0 5-HT_{2B}-R vs. t0 5-HT_{1A}-R+5-HT_{2B}-R and $p < 0.0001$, t0 5-HT_{2B}-R vs. t20 5-HT_{1A}-R+5-HT_{2B}-R, but 5-HT_{2B}-R clustering was unaffected upon 5-HT (1 μ M) stimulation. In the presence of 5-HT_{1A}-Rs, 5-HT_{2B}-R cluster area increased, as revealed by Kruskal-Wallis test, $P < 0.0001$, followed by Dunn's multiple comparisons test, $p < 0.0001$, t0 5-HT_{2B}-R vs. t0 5-HT_{1A}-R+5-HT_{2B}-R and $p < 0.0001$, t0 5-HT_{2B}-R vs. t20 5-HT_{1A}-R+5-HT_{2B}-R, but was unaffected upon 5-HT stimulation; their molecular density (integrated intensity) was not modified by 5-HT stimulation from 0 to 20 min in the absence or presence of 5-HT_{1A}-Rs. Data are expressed as percentage of their respective values at t0. (number of cells = 30-39 from 4 experiments). **(B).** Images of 5-HT_{1A}-R surface expression acquired by confocal microscopy. Top, 5-HT_{1A}-R (green) expression at the dendritic surface in the absence of 5-HT_{2B}-R and 0 (left), or 20 min (right) after 5-HT stimulation. Bottom, 5-HT_{1A}-R expression at the dendritic surface in the presence of 5-HT_{2B}-Rs and 0 (left), 20 min (middle) after 5-HT stimulation (1 μ M) or 20 min after 5-HT stimulation with the 5-HT_{2B}-R antagonist RS (right). Scale bar, 10 μ m. Bottom, Quantification of 5-HT_{1A}-R surface expression after 5-HT stimulation in the absence or presence of 5-HT_{2B}-R. The intensity of 5-HT_{1A}-R at the neuronal surface was decreased by 5-HT stimulation as revealed by Kruskal-Wallis test, $P < 0.0001$, followed by Dunn's multiple comparisons test, $p = 0.0003$, t0 5-HT_{1A}-R vs. t20 5-HT_{1A}-R. Similarly, in the presence of 5-HT_{2B}-R, the surface expression of 5-HT_{1A}-R was decreased upon 5-HT stimulation, $p < 0.0001$, t0 5-HT_{1A}-R+5-HT_{2B}-R vs. t20 5-HT_{1A}-R+5-HT_{2B}-R, but remained unaffected upon 5-HT stimulation in the presence of 5-HT_{2B}-R antagonist RS. Number of cells = 27-50, from 4 experiments. Data are expressed as percentage of their respective values at t0. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

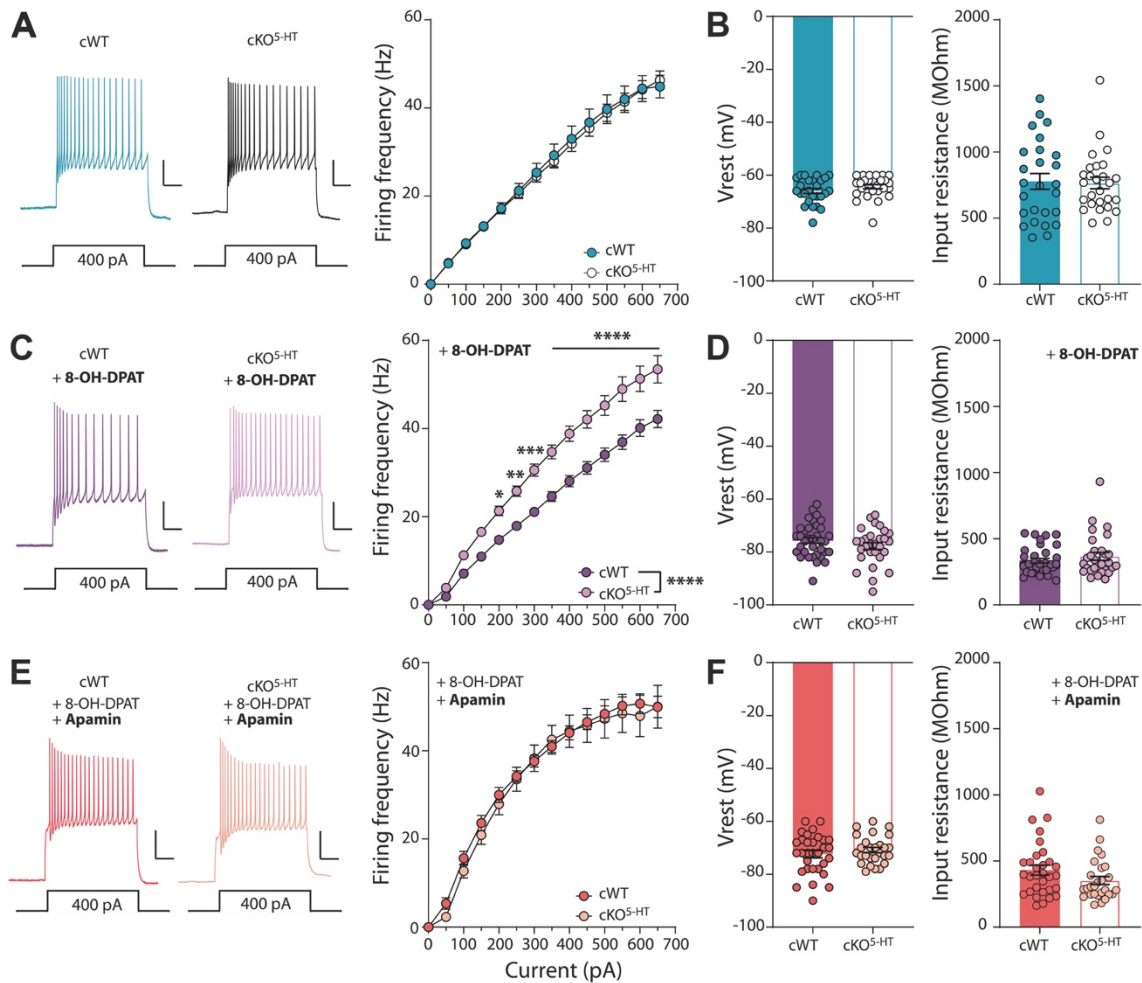


Figure 9: In the absence of 5-HT_{2B}-R, 5-HT neuron firing activity is increased upon 5-HT_{1A}-R stimulation through regulation of SK channels. (A). Left, sample spike trains evoked by a 400pA current injection in slices from cWT-RCE and cKO^{5-HT}-RCE mice; scale: 25pA/100ms. Right, F-I curve (mean ± SEM) for cWT (n = 26 cells from 7 mice) and cKO^{5-HT} 5-HT neurons (n = 27 cells from 6 mice); two-way RM ANOVA, genotype effect, not significant $p = 0.8715$. (B). Resting membrane potential (V_{rest}) and input resistance in cWT and cKO^{5-HT} 5-HT neurons. Bars represent the mean ± SEM; circles show individual recordings. (C). Left, same as in (A) in presence of 8-OH-DPAT (30 nM), a 5-HT_{1A}-R selective agonist. Right, F-I curve (mean ± SEM) for cWT (n = 35 cells from 5 mice) and cKO^{5-HT} 5-HT neurons (n = 29 cells from 4 mice) in the presence of 8-OH-DPAT (30 nM); two-way RM ANOVA revealed a significant increase in firing rate of cKO^{5-HT}, genotype effect $p < 0.0001$; Sidak's *post hoc* test* $p = 0.0274$, ** $p = 0.0028$, *** $p = 0.0001$, **** $p < 0.0001$. (D) Same as in (B) in the presence of 8-OH-DPAT (30 nM). (E) Left, same as in (A) and (C) in the presence of 8-OH-DPAT (30nM) and Apamin (20 nM), a selective SK channel blocker. Right, F-I curve (mean ± SEM) for cWT (n = 31 cells from 4 mice) and cKO^{5-HT} 5-HT neurons (n = 27 cells from 3 mice) in the presence of 8-OH-DPAT (30 nM) and Apamin (20 nM); two-way RM ANOVA, no genotype effect $p = 0.6979$. (F) Same as in (B) and (D) in the presence of 8-OH-DPAT (30 nM) and Apamin (20 nM).

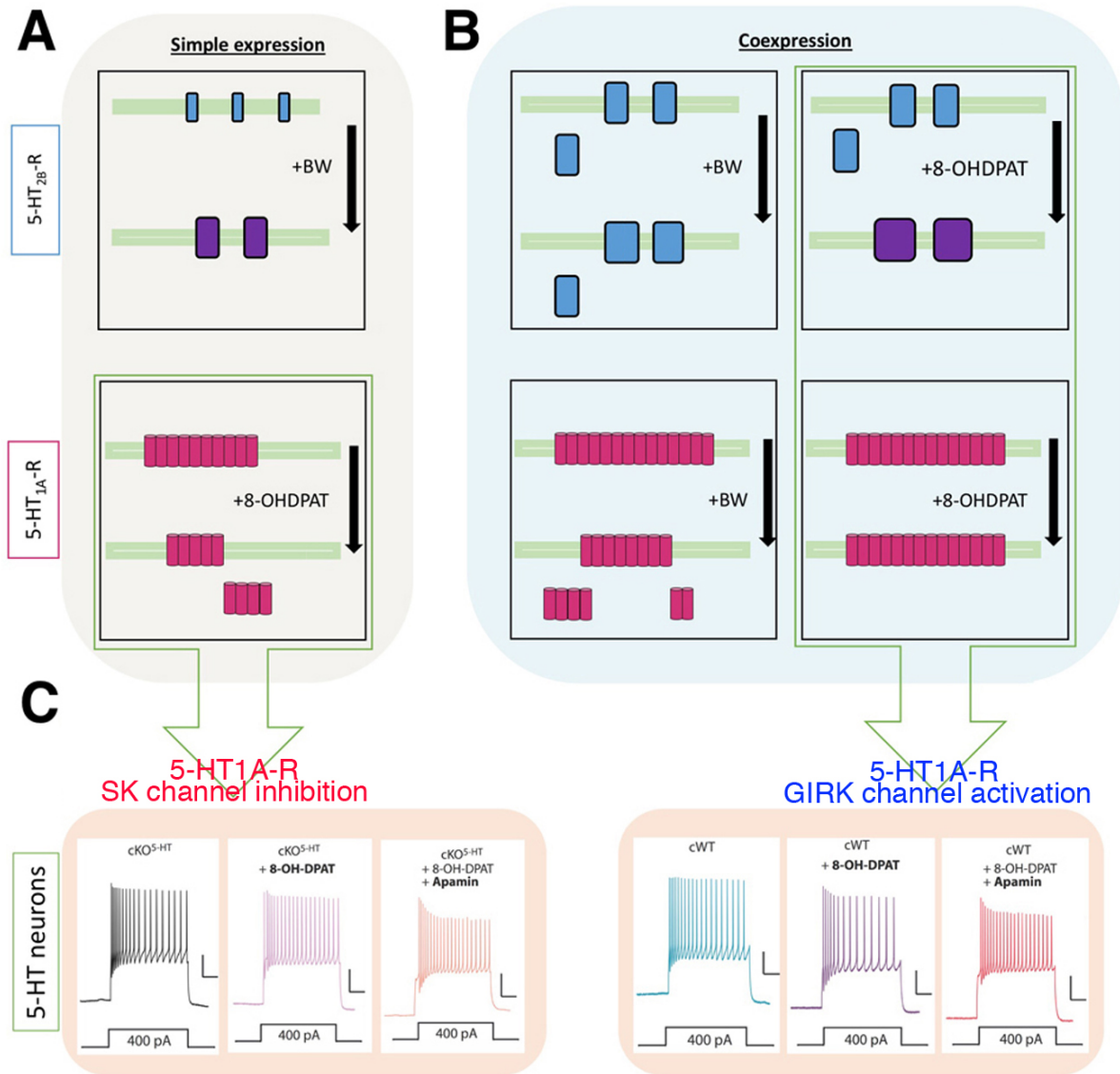


Figure 10: Effect of 5-HT_{1A}-Rs and 5-HT_{2B}-Rs co-expression on their membrane expression, clustering, and functional impact. (A). Separate expression of 5-HT_{1A}-Rs or 5-HT_{2B}-Rs. Top, BW stimulation increases 5-HT_{2B}-R clustering. Bottom, 8-OH-DPAT stimulation decreases surface expression of 5-HT_{1A}-Rs probably via endocytosis. (B). Co-expression of 5-HT_{2B}-Rs and 5-HT_{1A}-Rs and their stimulation affects the membrane expression of both receptors. Top, 5-HT_{1A}-R expression increases 5-HT_{2B}-R clustering. The 5-HT_{2B}-R stimulation by BW does not reverse the clustering effect of 5-HT_{1A}-Rs on 5-HT_{2B}-Rs. Stimulation by 8-OH-DPAT of 5-HT_{1A}-Rs further increases 5-HT_{2B}-R clustering. Bottom, Coexpression of 5-HT_{2B}-Rs increases 5-HT_{1A}-R surface expression. No further change in surface expression of 5-HT_{1A}-Rs is detected upon its stimulation with 8-OH-DPAT, but 5-HT_{2B}-R stimulation by BW decreases 5-HT_{1A}-R surface expression. (C). The 5-HT_{2B}-R/5-HT_{1A}-R co-expression/interaction regulates the excitability of 5-HT neurons. In the absence of 5-HT_{2B}-Rs (Separated expression, i.e. cKO^{5-HT}, left), 5-HT neuron firing activity is increased upon 5-HT_{1A}-R stimulation by 8-OH-DPAT, independently of SK channels blockade by apamin. By contrast, upon co-expression of 5-HT_{2B}-R (Co-expression, i.e. cWT, right), 5-HT neuron firing activity is decreased by 8-OH-DPAT unless SK channels are blocked by apamin.