



Hétérogénéité de la réactivité astrocytaire dans la maladie d'Alzheimer

Océane Guillemaud

► To cite this version:

Océane Guillemaud. Hétérogénéité de la réactivité astrocytaire dans la maladie d'Alzheimer. Biotechnologie. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASL003 . tel-04193086

HAL Id: tel-04193086

<https://theses.hal.science/tel-04193086>

Submitted on 1 Sep 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.

Hétérogénéité de la réactivité astrocytaire dans la maladie d'Alzheimer

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°568 : Signalisations et réseaux intégratifs en biologie (BIOSIGNE)
Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie
Réfèrent : Faculté de médecine

Unité Paris-Saclay, CEA, CNRS
Molecular Imaging Research Center (MIRCen)
Laboratoire des maladies neurodégénératives
92265 Fontenay-aux-Roses

**Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-Roses, le 11
septembre 2020, par**

Océane GUILLEMAUD

Composition du Jury

Elisabeth TRAIFFORT

Directrice de recherche, Université Paris-Saclay
Hôpital de Bicêtre

Présidente

Hélène HIRBEC

Chargée de recherche, Université de
Montpellier, Institut de génomique
fonctionnelle

Rapporteuse

Martine COHEN-SALMON

Directrice de recherche, Collège de France
Centre de recherche interdisciplinaire en
biologie

Rapporteuse

Carole ESCARTIN

Chargée de recherche, CNRS-CEA MIRCen

Directrice de thèse

Laurent PRADIER

Scientific fellow, Sanofi
Rare and neurologic diseases research
therapeutic area

Invité

A mes parents,

‘Nous sommes faits d’un étrange mélange d’acides nucléiques et de souvenirs, de rêves et de protéines, de cellules et de mots’.

-François Jacob, extrait du discours de réception à l’Académie française, en 1997-.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté, avec enthousiasme, d'examiner mon travail de thèse. En particulier, je tiens à remercier mes rapportrices, Hélène Hirbec et Martine Cohen-Salmon pour leurs précieux conseils et leur suivi au cours de la thèse, jusqu'à ce jour final de la soutenance. Merci aussi à Elisabeth Traiffort de participer à ce jury et de le présider.

Parce que la collaboration entre les académiques et le privé n'est à mon sens pas encore suffisamment développée, merci à Laurent Pradier de participer à ce jury.

Je remercie Philippe Hantraye et Emmanuel Brouillet de m'avoir accueillie au sein du laboratoire des maladies neurodégénératives à la fois pour mon stage de Master 2 et pour la thèse.

Mes plus grands remerciements sont évidemment destinés à Carole. Ces 3 ans et demi passés sous ton encadrement auront été riches en découvertes scientifiques et en ouverture d'esprit. Merci pour ton soutien sans failles et ta disponibilité à toute épreuve.

Tu as toujours fait preuve d'une grande bienveillance à mon égard autant sur un plan scientifique que sur un plan humain. Merci de ta patience et du temps que tu m'as accordé lorsque j'en ai eu besoin pour me ressourcer et retrouver le chemin de la thèse. Je crois que si je devais ne retenir qu'une chose, je dirais que j'ai croisé le chemin d'une grande scientifique pleine de curiosité, d'optimisme et emplie d'humilité.

Merci à notre équipe de Girl Power, la nouvelle team 3. Maria, merci pour tes conseils précieux et ta gentillesse qui m'ont permis de bien démarrer cette thèse avant que tu agrandisses ta famille par deux petites merveilles. Miriam, tu as su parfaitement t'intégrer dans l'équipe et je ne doute pas que ta thèse sera brillante car elle l'est déjà ! Lucile, toi qui a initié tous ces projets, je te souhaite le meilleur pour la suite, tu es ma définition d'une future bonne chercheuse !

Cette équipe, c'est aussi des anciennes qui ont très largement contribué à cette thèse. Je tiens tout particulièrement à remercier Kelly qui m'a passé le flambeau de ce projet et qui a réalisé un travail incroyable. Assidue, méthodique et toujours avec le sourire, tu as su m'apprendre tous les trucs et astuces avant de partir vers la nouvelle aventure du post-doc. Je tiens également à remercier Ludmila pour son super travail sur les rapporteurs, tu as également contribué toi aussi à l'exploration de l'hétérogénéité des astrocytes. Tes quantifs ont été longues et laborieuses mais qu'est ce qu'elles nous sont précieuses aujourd'hui ! Pleine de bonne humeur et d'optimisme, tu m'as toujours impressionné pour ta rigueur scientifique qui te destine à une belle carrière, j'en suis certaine ! Enfin, merci à Laurene, notre petite exclue qui travail sur Huntington ! Merci pour tous tes conseils et surtout ta gaité. Tu es une fille drôlement incroyable et je te souhaite un bel avenir !

Il serait finalement très ambitieux de décrire ce projet comme mien car c'est surtout grâce à la précieuse aide des autres membres du laboratoire que je suis parvenue à avancer !

Tout d'abord merci à Jan Bayer et Nathalie Deschamps pour les expériences de cytométrie. Nathalie, tu m'as aidé, toujours avec ta bonne humeur, à trier mes millions de

cellules marquées (euh...Millions avec 5 zéros en moins). Jan, merci pour tes précieux conseils techniques et surtout ton aide pour la découverte du logiciel Flowjo !

Merci également aux autres PI que j'ai rencontré au cours de ma thèse, Gilles, Alexis, Géraldine, Karine et Marc. Gilles merci pour ces anciennes réunions Team 1 et j'espère que tu te rappelleras des nombreux moments où tu es passé de façon impromptue dans le bureau pendant que...PA faisait le chef d'orchestre ! Alexis et Karine merci pour votre aide scientifique pour la production des virus et les expériences de comportement mais surtout merci pour votre humour et votre dynamisme. Ce petit café du matin avec vous, ça contribue aussi à mettre de bonne humeur pour la journée. Géraldine, merci de ton dévouement scientifique sans faille et je te souhaite le meilleur pour la suite. Marc, merci d'avoir toujours répondu présent à nos questions et merci de ton implication dans le DU, qui a été réellement bénéfique pour moi.

Je tiens tout particulièrement à remercier les ingénieurs et techniciens de MIRCen qui, sans aucunes exceptions, ont toujours répondu présents avec une grande vivacité. Merci à Caroline, Pauline et Fanny pour leurs précieuses aides en histologie. Merci à Martine, Mylène et Sueva pour leur efficacité à toute épreuve dans les injections. Merci aussi à l'équipe de production virale qui tourne à plein régime ! Charlene, Noëlle et Gwen, vous avez toujours été formidables ! Je tiens tout particulièrement à remercier deux personnes qui me sont très chères et dont j'espère bien garder contact au delà de la thèse : Noëlle et Gwen. Noëlle, la meilleure façon de te décrire, c'est de dire que tu es un rayon de soleil. Tu es passionnée, toujours de bonne humeur, pleine d'optimisme. Avec toi, on ne se sent jamais nul car tu as toujours les mots, les arguments pour trouver le meilleur en chaque être. Je te souhaite mille réussites au niveau personnel et professionnel et j'en suis certaine que la thèse ne marquera pas le point final de nos conversations ! Gwen, merci pour ta personnalité si singulière. Si je devais retenir un de tes traits de caractère, c'est sans aucun doute ta franchise. Merci de toujours dire ce que tu penses, ça fait de toi une personne rare ! On aura bien rigolé au cours de cette thèse et j'espère continuer d'avoir de tes nouvelles. Sur le plan professionnel, tu es la définition d'un élément indispensable. Ce serait une grosse perte pour le labo que tu partes mais si ton bonheur est ailleurs, alors fonce !

Un mot tout particulier aussi pour Marie-Claude, alias notre maman du labo. Tu m'en auras fait découvrir des techniques et des manips ! D'ailleurs, tu m'as communiqué ta passion pour les qPCR, au point d'essayer de battre mon record de temps pour remplir une 384 puits à la main ! Tu es toujours dynamique, passionnée et hyper pédagogue et pour ça je t'adresse un grand merci.

Enfin, je ne pourrais pas m'arrêter là et passer à la page suivante sans remercier des personnes qui ont été essentielles, primordiales, indispensables, irremplaçables, enfin bref vous aurez sûrement compris car là je n'ai plus de synonymes. Roulements de tambours, il s'agit bien évidemment de mes collègues de bureau. PA alias Vigneron le Zébullon, Fanny alias Nyfa Leboule-la-Queen et Charlotte alias Duwat efficace et pas chère. Un ENORME merci pour ces années passées ensemble qui auront été plus que formidables. On a rigolé à ne plus pouvoir respirer, pleurer à ne plus avoir de larmes et grandi ensemble tout au long de ce chemin de la thèse, parfois sinueux et semé d'embûches. Guillemaud alias l'Asticot vous adresse ses plus sincères remerciements qui viennent de tout, tout au fond de son petit cœur Chammalow.

Vous aurez remarqué que je n'ai employé que le mot collègue depuis le début de ce paragraphe mais en fait c'était pour vous faire languir avant mon discours final car ce n'est pas de simples collègues que j'ai rencontré mais... de précieux amis. Mon discours est court mais parce qu'il ne s'agit là que du début d'une relation d'amitié qui durera encore. Je tiens à adresser un petit mot particulier à Fanny pour la remercier de sa présence dans ma vie, en dehors du labo.

Des amis et des personnes formidables j'en ai aussi rencontré d'autres parce que oui à MIRCen, les étudiants sont en force ! Merci à JB, Yoyo, Melissa, Marina, Suzanne et les petites nouvelles à qui je souhaite plein de réussite : Emma, Pauline et Mathilde. Merci aussi à notre ancienne Clémence la petite, que j'ai eu la chance de connaître davantage après son départ !

Jean-le-Baptiste et Yoyo, toujours là pour rigoler, quel dommage que vous ne soyez pas arrivés au même moment que moi ! Heureusement on a pu en profiter et on continuera de le faire ! Marina, ma petite Célestine, et Suzanne, notre crêpe Suzette à tous, continuez de garder votre moral d'acier pour la thèse et votre implication ! Et vous aussi, on se reverra très vite (enfin, si Marina accepte de sortir de chez elle...) !

La thèse, c'est aussi l'encouragement et la confiance de ceux qui vous entourent. Pour ces rôles, rien de tel que le soutien infaillible de mes parents. L'émotion qui me submerge en pensant à vous m'empêche parfois de vous dire à quel point je suis reconnaissante de tout ce que vous m'avez appris, apporté, donné. Nous avons vécu tellement de moments hors du temps qui sont devenus aujourd'hui mes « madeleines de Proust ». Papa, Maman, merci pour ces racines, ces valeurs, cet amour inconditionnel. Grâce à vous, je sais à mon tour quel parent je veux être pour mon enfant. Ce n'est pas difficile. Mon exemple, c'est vous.

Peut importe où je serai dans 1, 5 ou 10 ans, j'aurai toujours un œil sur vous et je demeurerai à vos côtés, juste là à chaque fois que vous vous retournerez.

Maman (ou plutôt chérie comme j'ai l'habitude de t'appeler), je profite de ces quelques lignes pour te dire que le courage que j'ai pu trouver pendant ces 8 années d'études, c'est à toi et uniquement à toi que je le dois. Puisque tu as trouvé la force de combattre la vie et la maladie, je trouverai la force de combattre toutes les autres épreuves qui me seront présentées. Aujourd'hui, comme tous les autres jours, je sais que tu es fière de moi mais en réalité, c'est moi qui suis fière de toi, de ta détermination, de ton courage et de ta bienveillance. Pour résumer mes pensées, je te laisse relire le poème de Cummings.

« J'ai toujours ton cœur avec moi; Je le garde dans mon cœur.

Sans lui, jamais je ne suis.

Là où je vais, tu vas ma chair,

Et tout ce je fais par moi-même

Est ton fait ma chérie.

Je ne crains pas le destin,

Car tu es à jamais le mien ma douce.

Je ne veux pas d'autre monde,

Car, ma magnifique, tu es mon monde, mon vrai monde.

C'est le secret profond que nul ne connaît,

C'est la racine de la racine,

Le bourgeon du bourgeon,

Et le ciel du ciel d'un arbre appelé Vie,

Qui croît plus haut que l'âme ne saurait l'espérer

Et l'esprit le cache.
C'est la merveille qui maintient les étoiles éparses.
Je garde ton cœur,
Je l'ai dans mon cœur. »

Enfin, ce n'est pas sans émotion que mes dernières pensées vont à l'homme qui partage mes joies, mes peines et aujourd'hui mes réussites. Celui qui a su me montrer que l'on pouvait être à la fois une scientifique sans oublier ces rêves d'enfance, ceux d'être une princesse. A chacun de mes pas, tu as été là, pour me soutenir, pour m'épauler et pour apporter ton grain de sel (« Nico, il a toujours un truc à dire ». Signé papa), assaisonnant parfaitement la recette du bonheur. Aussi (et je ne le dirais pas deux fois), merci pour ton mauvais caractère qui a su contrebalancer le mien dans un équilibre dont on maîtrise aujourd'hui la justesse. Toutes les pages de cette thèse ne seraient pas suffisantes pour te remercier de ta présence, toujours emplie d'amour et de sincérité. Cette thèse, ça n'a pas seulement été l'heure d'une évolution professionnelle mais ça a également été l'occasion d'une aventure supplémentaire passée à tes côtés durant laquelle tu as été mon copain, puis mon compagnon et aujourd'hui mon mari (désolé, tu as signé, c'est trop tard !). Ce chapitre, ce n'est que le début d'une longue histoire qui se poursuivra, je l'espère, à l'horizon sans bornes des montagnes avec pour seuls compagnons le chevrottement des brebis et le rire des enfants.

Sommaire

Sommaire	1
Liste des abréviations	5
Liste des figures et tableaux	7
Introduction	9
I. Les astrocytes, des cellules multi-facettes essentielles au fonctionnement du système nerveux central	11
1. Les premières observations historiques, présages d'une hétérogénéité	11
2. Caractéristiques générales des astrocytes	12
2.1. Les astrocytes ont une morphologie complexe	12
2.2. Les astrocytes expriment des marqueurs spécifiques	13
2.3. Les astrocytes forment des réseaux fonctionnels	13
3. Les astrocytes sont impliqués dans une variété de fonctions cérébrales	14
3.1. Régulation du flux sanguin cérébral et de l'homéostasie ionique à la barrière hémato-encéphalique	14
3.2. Régulation de la formation des synapses, maturation et élimination	16
3.3. Recapture et recyclage des neurotransmetteurs	16
3.4. Régulation de la transmission et la plasticité synaptique à la synapse tripartite	17
3.5. Support métabolique, trophique et défense anti-oxydante	17
3.6. Implication des astrocytes dans des fonctions cérébrales supérieures	18
4. Les astrocytes, une population cellulaire hétérogène	18
4.1. Origine développementale de l'hétérogénéité	18
4.2. Diversité morphologique	20
4.3. Diversité moléculaire	22
4.4. Diversité fonctionnelle	26
4.5. Approches d'exploration de la diversité des astrocytes	27
II. Les astrocytes deviennent réactifs en conditions pathologiques	29
1. Définition et nomenclature	29
2. Caractéristiques des astrocytes réactifs	30
2.1. Les astrocytes réactifs présentent des changements morphologiques	30
2.2. Les astrocytes réactifs sont associés à d'importants changements moléculaires	32
2.3. La réactivité astrocytaire est une réponse persistante et réversible	33
3. Cascades de signalisation impliquées dans la réactivité astrocytaire	34
3.1. Signaux déclencheurs de la réactivité	34
3.2. Voie de signalisation JAK2-STAT3	35
3.3. Voie de signalisation NF- κ B	38
3.4. Autres voies de signalisation	39
4. Les astrocytes réactifs, une population hétérogène	41
4.1. Hétérogénéité régionale et topographique	45
4.2. Hétérogénéité morphologique	46
4.3. Hétérogénéité moléculaire	46
4.4. Hétérogénéité de signalisation	49
4.5. Hétérogénéité fonctionnelle	49
4.6. Hétérogénéité dans les maladies et leurs décours temporels	51

4.7. Limitations des approches d'exploration de l'hétérogénéité des astrocytes réactifs et perspectives	52
III. Les astrocytes réactifs dans la maladie d'Alzheimer	55
1. La maladie d'Alzheimer	55
1.1. Caractérisation clinique et physiopathologique	55
1.2. Diagnostic, biomarqueurs et imagerie	60
1.3. Mécanismes pathologiques	61
1.4. Traitements et essais cliniques	67
1.5. Modèles murins utilisés en recherche préclinique	68
2. Rôles des astrocytes réactifs dans la maladie d'Alzheimer	70
2.1. Homéostasie du glutamate	70
2.2. Métabolisme énergétique	71
2.3. Homéostasie ionique	71
2.4. Libération de gliotransmetteurs	73
2.5. Libération de cytokines et molécules inflammatoires	74
2.6. Participation au stress oxydant	75
2.7. Dégradation de l'A β	75
3. Rôles bénéfiques ou délétères des astrocytes réactifs dans la maladie d'Alzheimer ?	77
IV. Problématique et objectifs de la thèse	80
Résultats	81
I. La modulation de la réactivité astrocytaire améliore des déficits fonctionnels dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer	83
1. Contexte, objectif et synthèse de l'article 1	83
2. Contributions à l'article 1	84
3. Conclusions	84
4. Article 1	84
II. Rôle complexe des astrocytes réactifs dans le modèle murin 3xTg de la maladie d'Alzheimer	87
1. Contexte, objectif et synthèse de l'article 2	87
2. Contributions à l'article 2	87
3. Conclusions	88
4. Article 2	88
III. Exploration de l'hétérogénéité des astrocytes réactifs	90
1. Matériels et méthodes	90
1.1. Modèle murin de la maladie d'Alzheimer	90
1.1.1. Elevage	90
1.1.2. Souris transgéniques APP/PS1dE9	91
1.2. Vecteurs lentiviraux	91
1.2.1. Construction des vecteurs	91
1.2.2. Production des virus	92
1.2.3. Injections stéréotaxiques	94
1.3. Histologie	94
1.3.1. Préparation des échantillons	94
1.3.2. Comptage des cellules SRE-GFP/NRE-CFP	95
1.4. Tri cellulaire par cytométrie en flux	96
1.4.1. Dissociation des cellules	96
1.4.2. Tri des populations d'astrocytes réactifs par FACS	98

1.5. Analyses transcriptomiques sur astrocytes triés -----	98
1.5.1. Extraction d'ARN -----	98
1.5.2. Amplification d'ARN -----	98
1.5.3. Analyse par RT-qPCR -----	99
1.6. Quantification des activités de protéolyse par FACS -----	100
1.6.1. Marquage avec les sondes fluorescentes -----	100
1.6.2. Analyse par FACS -----	100
1.7. Statistiques -----	101
2. Validation des outils rapporteurs des voies de signalisation, SRE-GFP et NRE-CFP -----	104
2.1. Tropisme -----	104
2.2. Sensibilité du rapporteur SRE-GFP à la voie de signalisation STAT3 ----	104
3. Hétérogénéité des voies de signalisation STAT3 et NF-κB dans les astrocytes du cortex préfrontal -----	108
4. Hétérogénéité moléculaire dans les classes de signalisation d'astrocytes réactifs du cortex préfrontal -----	110
5. Hétérogénéité du système de protéostasie dans les classes de signalisation d'astrocytes réactifs du cortex préfrontal -----	114
Discussion -----	126
I. La voie JAK2-STAT3 est nécessaire et suffisante pour l'induction des caractéristiques principales de la réactivité -----	128
1. La voie JAK2-STAT3 est centrale dans la réactivité astrocytaire au cours des MND -----	128
2. Différentes approches pour moduler la voie JAK2-STAT3 -----	129
3. La voie JAK2-STAT3 agit comme un master régulateur de la réactivité dans la MA -----	130
4. Interactions de la voie JAK2-STAT3 avec d'autres signalisations -----	130
II. Rôle globalement délétère mais complexe des astrocytes réactifs dans la MA ---	131
1. La réactivité astrocytaire est associée à d'importants changements transcriptionnels -----	131
2. L'inhibition des astrocytes réactifs améliore certains déficits fonctionnels dans les modèles APP/PS1dE9 et 3xTg-AD -----	132
3. Sensibilité de la réactivité astrocytaire au contexte pathologique -----	134
III. Comment évaluer et quantifier l'hétérogénéité des astrocytes réactifs ? -----	138
1. Nécessité des approches d'exploration à l'échelle cellulaire -----	138
2. Limitations des marqueurs moléculaires de l'hétérogénéité -----	138
3. Avantages et limites des systèmes rapporteurs des voies de signalisation JAK2-STAT3 et NF- κ B -----	141
3.1. Les systèmes rapporteurs permettent un accès direct à la signalisation ----	141
3.2. Les rapporteurs lentiviraux sont des outils versatiles et sélectifs -----	141
3.3. Les rapporteurs lentiviraux sont compatibles avec d'autres explorations ---	142
3.4. Limites des systèmes rapporteurs -----	143
IV. La signalisation STAT3 et NF-κB révèle des classes d'astrocytes moléculairement et fonctionnellement différentes dans le cortex préfrontal de souris APP/PS1dE9 -	144
1. L'expression des voies de signalisation n'est pas homogène dans les astrocytes réactifs -----	144
2. L'expression des voies de signalisation est associée à une signature moléculaire dans les astrocytes réactifs -----	145

3. L'expression des voies de signalisation est associée à des fonctions spécifiques dans les astrocytes réactifs -----	146
4. Origine de l'hétérogénéité des astrocytes réactifs ?-----	148
Conclusion générale -----	152
Annexes -----	156
Références -----	159

Liste des abréviations

3xTg-AD Souris triples transgéniques
APP Amyloid precursor protein
APP/PS1dE9 Souris modèles de la maladie d'Alzheimer (APP^{swe}, PS1dE9)
AQP4 Aquaporin 4
ATP Adénosine triphosphate
A β Peptide amyloïde β
BDNF Brain-derived neurotrophic factor
BHE Barrière hémato-encéphalique
BMP Bone morphogenetic protein
CD Cluster of differentiation
CN/NFAT Calcineurin/Nuclear factor of activated T-cells
CNTF Ciliary neurotrophic factor
Cx Connexine
EphB1 Ephrin type-B receptor 1
FACS Fluorescence activated cell sorting
FGF Fibroblast growth factor
GABA Gamma aminobutyric acid
GAT GABA transporter
GFAP Glial fibrillary acidic protein
GFP Green fluorescent protein
GLT-1 Glutamate transporter 1
GS Glutamine synthase
IDE Insulin degrading enzyme
IKK I κ B kinase
IL Interleukin
IRM Imagerie par résonance magnétique
ISH *In situ* hybridization
JAK2 Janus kinase 2
JAK2^{ca} Forme constitutivement active de JAK2
KO Knocking out
LCR Liquide céphalo rachidien
LPS Lipopolysaccharide
LTD Long term depression
LTP Long term potentiation
LV Lentivirus
MA Maladie d'Alzheimer
MAGIC Mutliaddressable genome-integrated color
MAPK Mitogen-activated protein kinases
MCI Mild cognitive impairment
MMP Matrix metalloproteinase
MMSE Mini mental state evaluation
MND Maladies neurodégénératives
NEP Néprilisine
NFT Neurofibrillary tangles
NMDA N-methyl D-aspartate

NRE NF- κ B responsive element
OMS Organisation mondiale de la santé
PAP Prolongements astrocytaires péri-synaptiques
PCR Polymerase chain reaction
PFC Prefrontal cortex
PRR Pattern recognition receptor
PS Préséniline
ROS Reactive oxygen species
SEP Sclérose en plaques
SHH Sonic Hedgehog
SLA Sclérose latérale amyotrophique
smFISH Single molecule fluorescence *in situ* hybridization
SNC Système nerveux central
SOCS3 Suppressor of cytokine signaling 3
SRE STAT3 responsive element
STAT3 Signal transducer and activator of transcription 3
TEP Tomographie par émission de positons
TGF Transforming growth factor
TLR Toll-like receptors
TNF Tumor necrosis factor
TRAP Translating ribosome affinity purification
TREM2 Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
UPS Ubiquitine proteasome system
WNT Wingless

Liste des figures et tableaux

Figure 1. Premières illustrations d'astrocytes-----	12
Figure 2. Complexité des astrocytes -----	13
Figure 3. Les astrocytes sont essentiels au fonctionnement normal du SNC -----	15
Figure 4. Exemple d'hétérogénéité spatiotemporelle des astrocytes -----	20
Figure 5. Hétérogénéité morphologique des astrocytes-----	21
Figure 6. Les astrocytes de différentes régions présentent une hétérogénéité morphologique et moléculaire -----	22
Figure 7. Principales études révélant une hétérogénéité moléculaire des astrocytes -----	25
Figure 8. Différentes fonctions des astrocytes sont hétérogènes -----	27
Figure 9. Dessins originaux d'astrocytes réactifs dans le cerveau humain -----	30
Figure 10. Caractéristiques des astrocytes réactifs-----	32
Figure 11. Principaux stimuli et voies de signalisation impliquées dans l'induction et la régulation de la réactivité astrocytaire dans les MND -----	35
Figure 12. La voie JAK2-STAT3 -----	37
Figure 13. La voie NF- κ B -----	38
Figure 14. Signature transcriptomique des astrocytes réactifs de type A1 et A2 -----	48
Figure 15. Hétérogénéité des astrocytes réactifs : causes et manifestations -----	52
Figure 16. Caractéristiques histologiques de la maladie d'Alzheimer -----	56
Figure 17. Métabolisme de l'APP par la voie amyloïdogénique-----	57
Figure 18. Formation de dégénérescences neurofibrillaires et agrégation de la protéine Tau suite à son hyperphosphorylation -----	59
Figure 19. Biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer -----	61
Figure 20. Hypothèse de la cascade amyloïde-----	62
Figure 21. Propagation des plaques amyloïdes et de la pathologie Tau au cours de la MA et corrélation avec les symptômes cliniques -----	64
Figure 22. Modèle incluant les astrocytes parmi les autres biomarqueurs de la MA -----	65
Figure 23. Sécrétome des astrocytes réactifs libérant de nombreuses molécules actives modulant les communications avec les cellules voisines-----	72
Figure 24. Modèle de la libération de GABA par les astrocytes réactifs dans la MA ---	74
Figure 25. Rôles bénéfiques et délétères des astrocytes réactifs dans la MA : une épée à double tranchant-----	78
Figure 26. Schéma expérimental -----	93
Figure 27. Tri des différentes populations d'astrocytes réactifs par FACS pour l'analyse en qPCR -----	97
Figure 28. Analyse des activités de protéolyse par FACS-----	102
Figure 29. Systèmes rapporteurs des voies de signalisation STAT3 et NF- κ B -----	106
Figure 30. Les rapporteurs des voies de signalisation SRE-GFP et NRE-CFP infectent spécifiquement les astrocytes du PFC et le rapporteur SRE-GFP est sensible à l'activation de la voie STAT3-----	107
Figure 31. L'activation des voies de signalisation STAT3 et NF- κ B est hétérogène dans les astrocytes du PFC de souris APP -----	109
Figure 32. Dans les souris APP, l'activation différentielle des cascades est associée à des profils moléculaires différents -----	111
Figure 33. Schéma récapitulatif des gènes marqueurs de chaque population d'astrocytes réactifs identifiés en qPCR chez les souris APP-----	113

Figure 34. Systèmes rapporteurs des voies de signalisation -----	115
Figure 35. Analyse des activités cathepsine et protéasome dans les astrocytes des souris APP -----	117
Figure 36. Autre stratégie d'analyse des activités cathepsine et protéasome dans les astrocytes des souris APP -----	119
Figure 37. Analyse t-SNE de l'activité de protéolyse et des voies de signalisation activées dans les astrocytes APP -----	122
Figure supplémentaire 1. Dans les souris WT, l'activation des cascades est également associée à des profils moléculaires différents -----	124
Figure supplémentaire 2. Analyse des activités cathepsine et protéasome dans les astrocytes des souris WT -----	125
Figure 38. Modèle de l'induction de la réactivité astrocytaire par la voie JAK2-STAT3 chez les souris APP et 3xTg -----	137
Figure 39. Hypothèse de travail -----	140
Figure 40. Modèle de l'induction de la réactivité astrocytaire par les voies STAT3 et NF- κ B dans le PFC de souris APP -----	150
 Tableau 1. Sélection d'études pour illustrer l'hétérogénéité des astrocytes réactifs -----	 41
Tableau 2. Références des anticorps utilisés et leurs dilutions. -----	95
Tableau 3. Séquence des oligonucléotides utilisés pour l'analyse par qPCR. -----	100

Introduction

I. Les astrocytes, des cellules multi-facettes essentielles au fonctionnement du système nerveux central

1. Les premières observations historiques, présages d'une hétérogénéité

Les cellules gliales ont été décrites pour la première fois en 1856 par Rudolf Virchow, un physicien allemand. Il proposa le concept de « neuroglie » pour décrire ces cellules comme un élément interstitiel du cerveau, la « glue » ou le « nervenkitz » permettant de remplir l'espace entre les neurones et de leur assurer un bon positionnement (Virchow, 1856). Cette population cellulaire fut donc d'abord décrite comme homogène, avec un rôle de support (**Figure 1A**). Cependant, de précédentes études décrivaient déjà l'existence de différentes glies comme les cellules gliales de la rétine, découvertes par Heinrich Müller en 1851 (Müller, 1851) et un peu plus tard, les cellules de la glie radiaire dans le cervelet, décrite par Carl Bergmann en 1858 (García-Marín et al., 2007; Sotelo, 2003).

Finalement, ce n'est qu'en 1893 avec les travaux de Mihály Lenhossék, professeur d'anatomie, que ces cellules ont été appelées « astrocytes » pour leur forme étoilée (Von Lenhossék, 1893).

Les astrocytes, ont été par la suite divisés en différents sous-types morphologiques, les astrocytes protoplasmiques, présents dans la substance grise avec de nombreuses ramifications courtes et les astrocytes fibreux, présents dans la substance blanche avec moins de ramifications mais plus longues et lisses (Andriezen, 1893). Néanmoins, ce sont les travaux de Camillo Golgi (Golgi, 1903) et Ramon y Cajal (Ramon y Cajal, 1920) qui ont permis de mieux caractériser ces cellules en terme de morphologie. A l'aide de leurs observations histologiques qui ont données lieu à certains des plus beaux dessins neuro-anatomiques, ils ont notamment pu émettre plusieurs hypothèses intéressantes sur les rôles physiologiques des astrocytes. En 1872, Golgi a développé la coloration au nitrate d'argent, appelée « la réaction noire », qui lui a permis la description de différentes formes d'astrocytes dans le cerveau. Ses observations lui ont également permis d'identifier un contact étroit entre les astrocytes et les vaisseaux sanguins, dont il suggéra un rôle de support métabolique des astrocytes envers les neurones (**Figure 1B**).

La technique d'imprégnation argentique au chlorure d'or, développée par Ramon y Cajal, a permis par la suite d'étudier encore plus finement les astrocytes (Ramon y Cajal, 1910). On sait aujourd'hui que cette coloration histologique révélait, entre autres, les filaments intermédiaires comme la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), d'où son utilisation pour visualiser les astrocytes. Cette technique révolutionna le concept de « nervenkitz » et Ramon y Cajal fut l'un des premiers à émettre l'hypothèse selon laquelle les astrocytes libéreraient des substances modulant l'activité des neurones en les décrivant comme « une vaste glande endocrine », hypothèse validée des années plus tard. Dans ses travaux, Ramon y Cajal souligna aussi la complexité des astrocytes humains par leurs finesse et leurs richesses morphologiques par rapport à d'autres espèces (**Figure 1C**). Pour la reconnaissance de leurs travaux sur la structure du système nerveux, Ramon y Cajal et Camillo Golgi ont reçu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1906. Finalement, ces travaux sur l'hétérogénéité morphologique des astrocytes, leurs nombreux

rôles et leurs complexités ont plus de 100 ans mais influencent et inspirent toujours les chercheurs d'aujourd'hui (García-Marín et al., 2007; Sotelo, 2003).

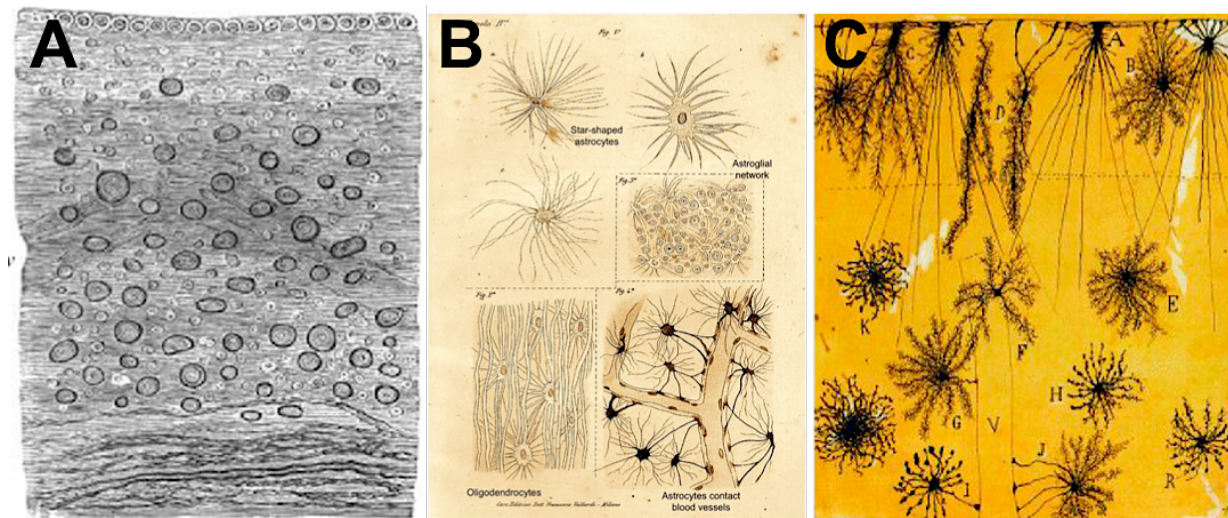


Figure 1. Premières illustrations d'astrocytes. A. Illustration de la « neuroglie » par Virchow. B. Cellules neurogliales marquées avec la coloration au nitrate d'argent et dessinées par Golgi. C. Dessins de Ramon y Cajal illustrant déjà une hétérogénéité morphologique. Adapté de Verkhratsky (2014).

2. Caractéristiques générales des astrocytes

2.1. Les astrocytes ont une morphologie complexe

Initialement caractérisés par leur morphologie étoilée par Golgi et Ramon y Cajal, les astrocytes se révèlent avoir une arborisation plus complexe qui ressemble davantage à un buisson qu'à une étoile (Bushong et al., 2002; Wilhelmsson et al., 2006b) (**Figure 2A**). Cette complexité morphologique augmente avec la taille du cerveau (Oberheim et al., 2009; von Bartheld et al., 2016). Il semble que ce soit davantage cette complexité qui diverge entre les modèles murins et les primates non humains et humains, plus que le nombre d'astrocytes (Herculano-Houzel et al., 2014). Cette arborisation dense leur permet un positionnement stratégique à la fois en contact avec les vaisseaux sanguins via les pieds astrocytaires (**Figure 2C**) mais aussi à proximité des synapses où ils constituent la synapse tripartite (**Figure 2D**). De cette sorte, ils peuvent réguler les échanges à travers la BHE (Barrière hémato-encéphalique) et participer activement à la régulation de la transmission et la plasticité synaptique (Alexei Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Les astrocytes sont donc une population significative en nombre, mais surtout dotée d'une grande complexité morphologique qui révèle déjà ses rôles essentiels pour le bon fonctionnement du système nerveux.

2.2. Les astrocytes expriment des marqueurs spécifiques

A l'origine, différents marqueurs ont été identifiés pour détecter les astrocytes comme la *Gfap* et la *Vimentine*, la protéine B de liaison du Ca^{2+} (*S100\beta*) et la glutamine synthétase (protéine GS, gène *Glul*) (Sofroniew & Vinters, 2010). Aujourd'hui les techniques de transcriptomique comme le RNAseq (séquençage des ARNs) sur des astrocytes triés/isolés ont confirmés l'expression sélective de ces marqueurs dans les astrocytes et ont permis d'identifier de nouveaux marqueurs. Par exemple, des gènes comme l'aldéhyde dehydrogénase *Aldh1l1*, *Kcnj10* (codant le canal potassique Kir4.1), *Slc1a2* (codant le transporteur du glutamate GLT-1), *Gja1* (codant la Connexin 43) ou encore *Aldoc* codant pour l'aldolase C, une enzyme glycolytique, ont été montrés comme enrichis dans les astrocytes (Boisvert et al., 2018; Cahoy et al., 2008; Chai et al., 2017a; Morel et al., 2017). Malgré un panel de gènes caractéristiques, l'expression de la *Gfap* reste le principal marqueur utilisé pour détecter les astrocytes.

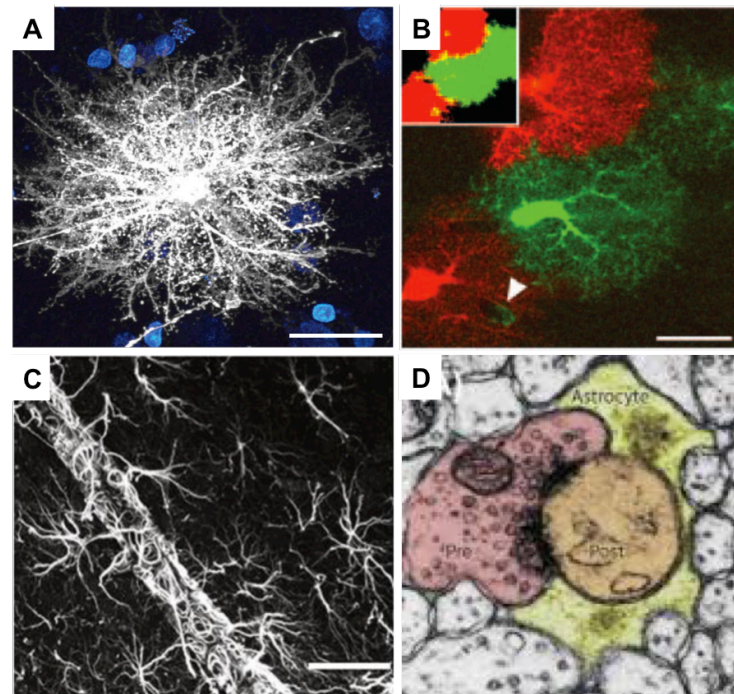


Figure 2. Complexité des astrocytes. Les astrocytes présentent une morphologie « en buisson » avec de nombreux prolongements ramifiés (A). Ils sont organisés en domaines non superposés (B), entourent les vaisseaux sanguins via les pieds astrocytaires (C) et étendent leurs prolongements à la synapse tripartite (D). A. Astrocyte dialysé par la sonde Dil (Oberheim, 2009). B. Astrocytes dialysés par la sonde Lucifer Yellow (vert) et Alexafluor 568 (rouge) (Wilhelmsson, 2006). C. Image en microscopie confocale d'astrocytes GFAP⁺ entourant un vaisseau sanguin (Kacem, 1998). D. Image en microscopie électronique d'astrocyte (jaune) autour d'une synapse (élément pré-synaptique en rose et élément post-synaptique en orange) (Halassa et al, 2007).

2.3. Les astrocytes forment des réseaux fonctionnels

A l'aide de leurs nombreux prolongements, les astrocytes occupent un domaine tridimensionnel important qui englobe plus de 300 dendrites (Halassa et al., 2007) et

140 000 synapses par astrocyte pour certaines structures comme l'hippocampe (Bushong et al., 2002). Chaque astrocyte couvre un domaine tridimensionnel unique avec moins de 5% de superposition avec les astrocytes voisins (Nedergaard et al., 2003) (**Figure 2B**). Ces astrocytes sont organisés en réseau de cellules connectées entre elles par des jonctions communicantes, appelées jonctions gap. Les jonctions communicantes sont composées de 2 hémicanaux, les connexons, provenant chacun de cellules adjacentes. Chaque connexon est formé de 6 protéines transmembranaires, appelées connexine (Cx). Les astrocytes expriment principalement les *Cx30* et *Cx43* (Rouach et al., 2002). Les principales fonctions de ces réseaux sont de tamponner les ions potassium libérés dans le milieu extracellulaire lors d'une activité neuronale, de fournir des substrats énergétiques aux neurones et de faciliter la propagation des signaux calciques. En effet, les astrocytes sont des cellules non excitables mais qui présentent d'importantes variations de leur concentration en calcium intracellulaire. Ces signaux calciques sont variés et peuvent être spontanés ou provoqués par l'activité neuronale (Bazargani & Attwell, 2016; Dallérac et al., 2018). Une étude récente montre que les variations de Ca^{2+} dans les astrocytes sont essentiellement asynchrones et ont lieu dans des microdomaines des prolongements astrocytaires (Bindocci et al., 2017). Ces signaux Ca^{2+} démontrent donc que les astrocytes reçoivent et intègrent des informations provenant des neurones et assurent une communication bi-directionnelle, notamment en libérant des gliotransmetteurs (Khakh & Sofroniew, 2015) (voir paragraphe I.3.4).

3. Les astrocytes sont impliqués dans une variété de fonctions cérébrales

Les astrocytes régulent un grand nombre de fonctions dans le SNC (système nerveux central) dont les principales sont décrites dans les paragraphes suivants (**Figure 3**).

3.1. Régulation du flux sanguin cérébral et de l'homéostasie ionique à la barrière hémato-encéphalique

L'unité neuro-vasculaire permet de réguler la BHE qui correspond à une barrière physique entre le sang et le parenchyme cérébral. La BHE est composée de cellules endothéliales, de péricytes, d'une matrice extracellulaire contre lesquels sont apposés les pieds astrocytaires. Les astrocytes sont impliqués dans la formation et le maintien de la BHE en sécrétant des facteurs angiogéniques (Alvarez et al., 2013; Boulay et al., 2016) mais également dans sa régulation en modulant sa perméabilité (Abbott et al., 2006; Pfaff et al., 2006). Enfin, les astrocytes libèrent des médiateurs comme le monoxyde d'azote et la prostaglandine capables de moduler le diamètre des vaisseaux en fonction de l'activité neuronale (Macvicar & Newman, 2015).

Les astrocytes au contact de la BHE sont impliqués dans l'homéostasie des ions et de l'eau. En particulier, ils tamponnent les ions K^+ , libérés dans l'espace extracellulaire durant l'activité neuronale. Les pieds astrocytaires expriment des niveaux importants du canal potassique *Kcnj10* (protéine Kir4.1) qui permet le transport du K^+ de l'espace extracellulaire à la circulation sanguine (Alvarez et al., 2013; Bellot-Saez et al., 2017). Les astrocytes participent aussi à l'homéostasie de l'eau produite en grande quantité lors de la

consommation du glucose. Les astrocytes transportent l'eau jusqu'à la circulation sanguine à l'aide du canal eau aquaporin-4 (AQP-4), enrichi au niveau des pieds astrocytaires (Boulay et al., 2017), empêchant ainsi un gonflement cellulaire. Enfin, par leur positionnement stratégique, les astrocytes jouent aussi un rôle dans l'homéostasie entre le système vasculaire, le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le liquide interstitiel. Au niveau des espaces périvasculaires, le LCR échange des molécules solubles avec le liquide interstitiel via les AQP-4. Ces molécules solubles peuvent être des déchets, comme l'A β , et ce système appelé glymphatique permet donc leur élimination dans la circulation générale (Plog & Nedergaard, 2018) (voir paragraphe III.2.7).

En plus du maintien de l'homéostasie du K⁺, les astrocytes régulent l'homéostasie d'autres ions comme le Na⁺ et le Cl⁻. La concentration en Na⁺ dans les astrocytes est principalement régulée par la pompe Na⁺/K⁺ ATPase mais aussi par le transporteur Na⁺/K⁺/2Cl⁻ (Michelle L. Olsen et al., 2015). De manière intéressante, l'augmentation de l'activité synaptique induit des courants transitoires de Na⁺ dans les astrocytes (Rose & Karus, 2013; Alexei Verkhratsky et al., 2018).

Les astrocytes participent également au maintien du pH en métabolisant le CO₂ en HCO₃⁻ et H⁺ et en exportant ces ions dans l'espace extracellulaire à travers le co-transporteur Na⁺/HCO₃⁻ (Theparambil & Deitmer, 2015). Les astrocytes maintiennent aussi le pH à l'aide de l'échangeur Na⁺/H⁺ (Turovsky et al., 2016).

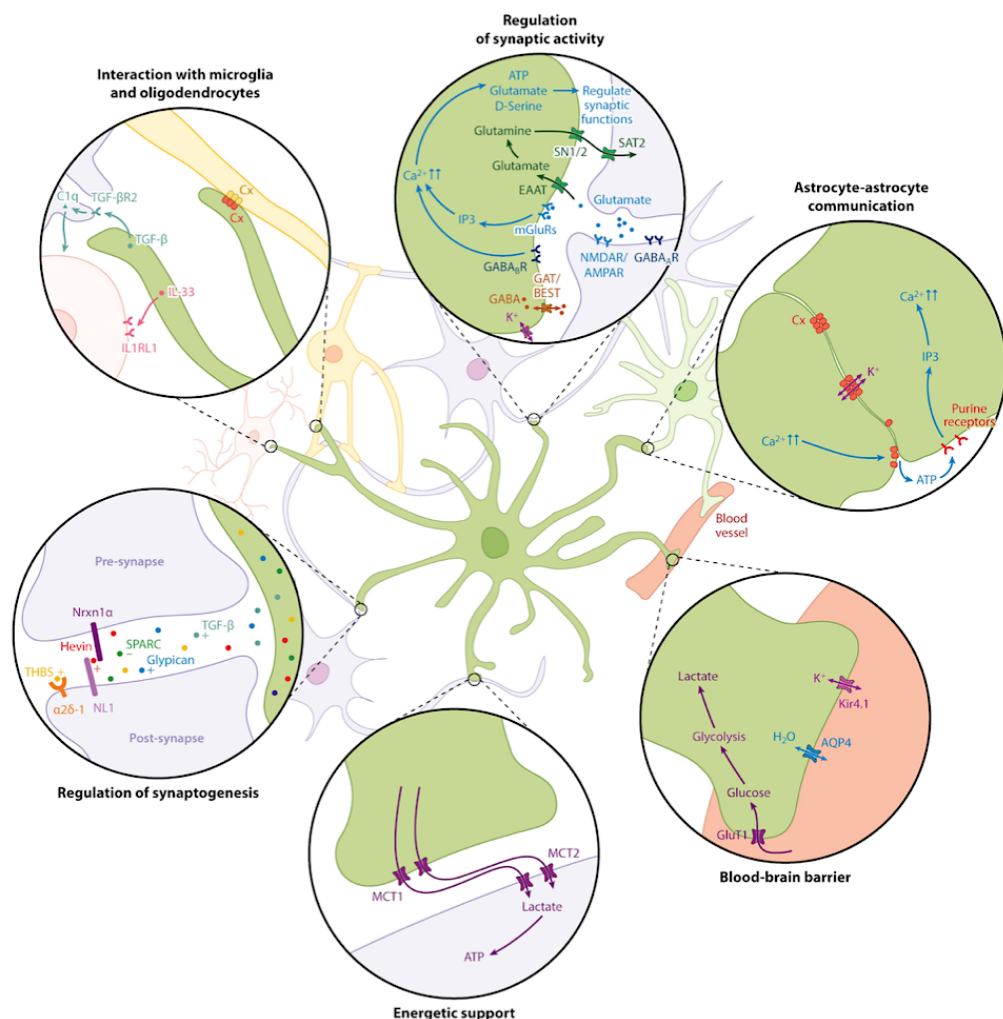


Figure 3. Les astrocytes sont essentiels au fonctionnement normal du SNC. Résumé schématique des divers rôles exercés par les astrocytes. Extrait de Khakh et Deneen, 2019.

3.2. Régulation de la formation des synapses, maturation et élimination

Les astrocytes sont impliqués dans la formation des circuits neuronaux depuis la formation de synapses immatures à leur maturation et enfin à l'élimination des synapses excédentaires et l'affinement des connexions synaptiques. Ces phénomènes ont été démontrés au cours du développement mais aussi chez l'adulte (Clarke & Barres, 2013; Pfrieger, 2010; A Verkhratsky & Nedergaard, 2018).

La période de développement où la majorité des synapses sont formées coïncide avec la période de différenciation et de maturation des astrocytes, entre la 2^{ème} et 3^{ème} semaine post-natale chez la souris. Dans un modèle de souris sans précurseurs d'astrocytes, on constate une neurodégénérescence importante (Chung et al., 2015). Plusieurs molécules sécrétées par les astrocytes ont été impliquées dans la formation des synapses comme le BDNF (Brain-derived neurotrophic factor), le cholestérol, hevin, SPARC et les thrombospondines (Chung et al., 2015; Clarke & Barres, 2013).

Les astrocytes contribuent également activement à l'élimination des synapses de manière activité-dépendante lors du développement et chez l'adulte (Lee & Chung, 2019). En effet, un affinage du réseau neuronal s'opère lors d'un processus d'apprentissage et de mémoire accompagné de la formation de nouvelles synapses associé à l'élimination d'autres synapses préexistantes. Plusieurs études montrent un rôle indirect des astrocytes dans l'élimination des synapses via la libération de TGF- β (Transforming growth factor), induisant une surexpression de la protéine du complément C1q au niveau de la synapse. Les neurones marqués sont ensuite éliminés par phagocytose de la microglie (Bialas & Stevens, 2013). D'autres études montrent un rôle direct des astrocytes dans l'élimination des synapses dans le système réticulogéniculé. Cette élimination se fait au moyen d'une phagocytose astrocytaire impliquant un réarrangement de l'actine nécessaire à la dynamique membranaire de recouvrement des débris cellulaires (Kinchen et al., 2005). Ce mécanisme est dépendant des voies MEGF10 et MERTK (Chung et al., 2013).

3.3. Recapture et recyclage des neurotransmetteurs

L'un des rôles majeurs des astrocytes est de recapter les neurotransmetteurs, en particulier le glutamate libéré dans la fente synaptique au cours d'une activité neuronale. Pour cela, les astrocytes expriment des transporteurs à haute affinité du glutamate comme GLAST (gène *Slc1a1* pour Solute carrier family 1 member 1) et GLT-1 (gène *Slc1a2*) (Danbolt et al., 2016). GLT-1 est principalement exprimé dans les astrocytes de l'hippocampe, du cortex et du striatum alors que GLAST est fortement exprimé dans les astrocytes du cervelet (Regan et al., 2007). Cette recapture est essentielle car elle permet de limiter l'action du glutamate dans l'espace (activation d'autres récepteurs, notamment extra-synaptiques) et dans le temps afin de protéger les neurones de l'excitotoxicité (Danbolt et al., 2016). A l'aide de ces transporteurs, les astrocytes sont aussi impliqués dans le recyclage du glutamate, métabolisé en glutamine par la GS. La glutamine est ensuite utilisée par les neurones comme précurseurs du glutamate (Magistretti & Allaman, 2015).

Les astrocytes recapturent aussi le GABA (γ -aminobutyric acid) via les transporteurs GAT (GABA transporter). GAT1, situé sur les prolongements astrocytaires, est impliqué dans le contrôle de l'action du GABA à la synapse alors que

GAT3 régule l'action du GABA sur les récepteurs pré-synaptiques GABAB (Beenhakker & Huguenard, 2010).

3.4. Régulation de la transmission et la plasticité synaptique à la synapse tripartite

Les astrocytes émettent leurs prolongements à la synapse pour former la synapse tripartite (Araque et al., 1999). Ils expriment plusieurs récepteurs aux neurotransmetteurs, ce qui leur permet de détecter l'activité neuronale. En réponse à cette activité, ils émettent des signaux Ca^{2+} et Na^+ (Araque et al., 2014; Savtchouk & Volterra, 2018). Une augmentation du Ca^{2+} peut provoquer une libération de gliotransmetteurs comme le glutamate, le GABA, l'ATP (Adénosine triphosphate) et la D-Sérine (Araque et al., 2014). Ces gliotransmetteurs agissent sur différentes cibles pré et post-synaptiques pour réguler la transmission et la plasticité synaptique comme la LTP (Long term potentiation) et la LTD (Long term depression) par différents mécanismes (Panatier et al., 2011; Savtchouk & Volterra, 2018). De manière intéressante, les astrocytes sont capables d'activer de manière synchronisée un réseau de neurones si la vague calcique se propage aux astrocytes voisins connectés via les Cx (Angulo et al., 2004). La gliotransmission reste néanmoins débattue et les mécanismes sous-jacents semblent être dépendants de la région cérébrale et des circuits neuronaux (Agulhon et al., 2010, 2012; Fiocco & McCarthy, 2018; Savtchouk & Volterra, 2018).

Les astrocytes peuvent aussi moduler la transmission synaptique à travers des changements morphologiques des prolongements astrocytaires péri-synaptiques (PAP) avec l'activité neuronale. Par exemple, l'induction de la LTP dans l'hippocampe induit une augmentation de la couverture de la synapse par les PAP (Bernardinelli et al., 2014). Une étude récente montre que l'activité neuronale entraîne une augmentation de l'expression de la Cx30 dans les astrocytes, entraînant un remodelage morphologique (Ghezali et al., 2020). Globalement, ces remodelages changent la couverture des PAP par les astrocytes et entraînent alors une modulation de la transmission et de la plasticité synaptique par re-distribution des transporteurs au glutamate astrocytaire (Pannasch & Rouach, 2013).

3.5. Support métabolique, trophique et défense anti-oxydante

Les astrocytes, associés aux vaisseaux sanguins, forment l'unité neuro-vasculaire, permettant entre autres d'assurer un support métabolique nécessaire au fonctionnement et à la survie des neurones. Ils jouent un rôle essentiel dans le couplage neuro-métabolique, phénomène dans lequel la consommation de glucose est étroitement associée à l'activité synaptique (Magistretti & Allaman, 2015). Selon l'hypothèse de la « lactate shuttle », le glutamate libéré lors d'une augmentation de l'activité synaptique est capté par les astrocytes qui consomment plus de glucose et le transforment en lactate, ensuite transporté dans les neurones pour être métabolisé dans le cycle de Krebs. Mais cette hypothèse reste controversée (Dienel, 2019), notamment car les neurones sont aussi capables d'utiliser directement le glucose (Díaz-García & Yellen, 2019; Lundgaard et al., 2015) ou encore le glycogène dont les réserves sont principalement situées dans les astrocytes (Magistretti, 2006).

Les astrocytes apportent un support trophique tout au long de la vie des neurones grâce à la sécrétion de différents facteurs comme le BDNF et le CNTF (Ciliary neurotrophic factor). Ils libèrent également des cytokines, des neurostéroïdes et des molécules d'adhésion impliquées dans la croissance neuritique (Allaman et al., 2011; Sofroniew & Vinters, 2010).

Les astrocytes jouent également un rôle central dans la défense anti-oxydante du cerveau. La respiration produit en effet des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont délétères pour les neurones. Pour cela, les astrocytes libèrent des molécules anti-oxydantes comme le glutathion, l'acide ascorbique et la vitamine E (Allaman et al., 2011). Ces molécules sont ensuite utilisées par les neurones pour neutraliser les ROS.

3.6. Implication des astrocytes dans des fonctions cérébrales supérieures

Le rôle des astrocytes dans la consolidation mnésique a par exemple été démontré (Gibbs et al., 2008) et l'activation des astrocytes n'est pas seulement nécessaire pour la plasticité synaptique mais surtout suffisante pour induire une LTP dans l'hippocampe (Adamsky et al., 2018). Les astrocytes sont également impliqués dans la régulation du sommeil à travers la libération d'adénosine agissant sur les récepteurs adénosine A1R (Halassa et al., 2009) mais aussi dans l'élimination de molécules solubles via le système glymphatique durant le sommeil (Haydon, 2017). Des fonctions astrocytaires propres à des circuits neuronaux ont été identifiées comme dans le centre respiratoire du tronc cérébral où des astrocytes répondent à des diminutions de pH (Gourine et al., 2010). Enfin, le rôle des astrocytes dans la prise alimentaire a aussi été démontré (Douglass et al., 2017).

4. Les astrocytes, une population cellulaire hétérogène

Depuis les premiers travaux de Golgi et Ramon y Cajal, il est communément admis que les neurones forment une population hétérogène associée à de multiples propriétés et fonctions. En revanche, les astrocytes ont traditionnellement été considérés comme une population cellulaire homogène et ubiquitaire. Mais comment une population homogène pourrait-elle réaliser une telle diversité de fonctions précédemment décrites ? Depuis une vingtaine d'années, de nombreux scientifiques bousculent ce concept et les études récentes donnent une appréciation de l'hétérogénéité des astrocytes à différents niveaux, allant de la morphologie à la fonctionnalité et soulignant l'importance de considérer ces diverses populations dans l'organisation du SNC et la communication neurone-astrocyte (Anderson et al., 2014; Ben Haim & Rowitch, 2016; Zhang & Barres, 2010).

4.1. Origine développementale de l'hétérogénéité

Le développement des astrocytes a longtemps été considéré comme homogène, dérivant d'un même pool de progéniteur alors que des programmes de diversification des différents types de neurones originaires de progéniteurs distincts ont bien été démontrés.

Plusieurs études sont aujourd'hui en faveur d'une hétérogénéité spatiotemporelle des populations d'astrocytes. Dans la moelle épinière, 3 sous-types distincts d'astrocytes de la substance blanche (VA1, VA2 et VA3) ont été identifiés et dérivent de différents domaines de progéniteurs dans le tube neural (p1, p2 et p3) (Hochstim et al., 2008) (**Figure 4**). Ces progéniteurs d'astrocytes sont spécifiés régionalement par des gradients dorso-ventraux de signaux sécrétés comme BMP (Bone morphogenetic proteins), WNT (Wingless) et SHH (Sonic hedgehog) (Jessell, 2000). Ces gradients contrôlent l'expression de protéines homéodomaines et de facteurs de transcriptions déterminant les domaines de progéniteurs régionalement distincts. Il a par exemple été montré que l'expression du facteur de transcription SCL par les progéniteurs p2 était nécessaire à la production des astrocytes de type VA2 (Muroyama et al., 2005) (**Figure 4**). Une autre étude montre que les astrocytes de la moelle épinière post-natale expriment des gènes de façon région spécifique (Molofsky et al., 2014). Dans le cerveau adulte, il a aussi été montré que la position des astrocytes dépend de la localisation de leurs progéniteurs dans la zone ventriculaire durant le développement (Tsai et al., 2012). Il a en effet été montré que différents sous-types de cellules souches astrocytaires sont formés selon leur localisation dorso-ventrale dans la zone sous-ventriculaire (Merkle et al., 2007). Ces cellules souches astrocytaires répondent à la signalisation SHH et l'expression des facteurs de transcription Nkx6.2 et Zic détermine leurs domaines distincts (Merkle et al., 2014). Enfin, certaines études en culture montrent que la diversité astrocytaire est programmée indépendamment des neurones. Par exemple, des astrocytes dérivés des parties ventrales et dorsales de la moelle épinière maintiennent leurs caractéristiques régionales distinctes en culture, même en absence de neurones (Molofsky et al., 2014). De même, des cellules souches pluripotentes humaines programmées avec des morphogènes pour maintenir une identité dorso-ventrale, génèrent des sous-types d'astrocytes distincts exprimant différents facteurs de transcription en absence de neurones (Krencik et al., 2011). Une étude récente de la même équipe montre également que l'utilisation de morphogènes ventraux ou caudaux sur des cellules souches pluripotentes humaines entraîne la génération d'astrocytes avec différentes identités régionales en fonction des morphogènes (Li et al., 2018). Néanmoins, d'autres études suggèrent un rôle important de l'activité neuronale et la génération de sous-types d'astrocytes s'explique probablement par un modèle mixte dans lequel les astrocytes sont spécifiés en fonction de programmes embryonnaires et maturés dans leur environnement local par leurs interactions avec les neurones (Bayraktar et al., 2015; Ben Haim & Rowitch, 2016; Molofsky et al., 2012; Zhang & Barres, 2010). En effet, une étude récente a étudié le développement des astrocytes dans le cortex de souris à l'aide d'une technique innovante permettant de marquer les cellules progénitrices neurales avec des couleurs distinctes pour pouvoir tracer leur devenir spatiotemporel (MAGIC, Multiaddressable genome-integrated color). Cette étude révèle un développement des astrocytes en 3 étapes : les cellules progénitrices colonisent le cortex puis elles prolifèrent localement et enfin, l'environnement local détermine l'expansion des clones astrocytaires et le morphotype final (Clavreul et al., 2019).

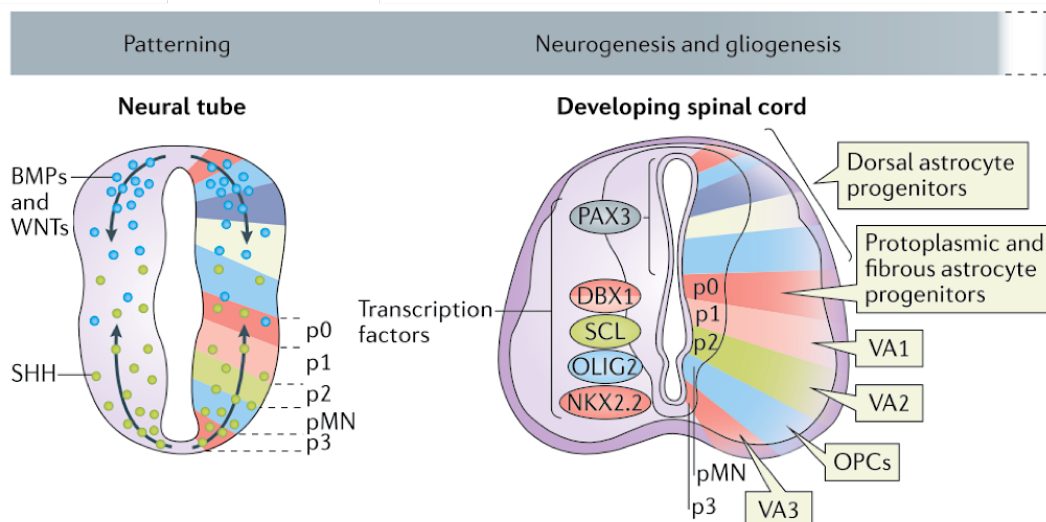


Figure 4. Exemple d'hétérogénéité spatiotemporelle des astrocytes. Les progéniteurs embryonnaires sont établis par des gradients dorso-ventraux de signaux sécrétés. Ces gradients contrôlent l'expression de protéines à homéodomaine et facteur de transcription qui déterminent les domaines de progéniteurs p1, p2 et p3. Ces progéniteurs donnent naissance à 3 sous-types d'astrocytes de la substance blanche, VA1, VA2 et VA3. Extrait de Ben Haim, 2017.

4.2. Diversité morphologique

Il y a plus de 100 ans, la diversité morphologique des astrocytes avait déjà été soulignée dans les études de Golgi et Ramon y Cajal (**Figure 1C**). Initialement classés en 2 catégories, les astrocytes fibreux de la substance blanche et les astrocytes protoplasmiques de la substance grise, d'autres classes d'astrocytes spécifiques d'une région cérébrale ont été décrites depuis (Emsley & Macklis, 2006). Par exemple, les tanocytes sont spécifiques du troisième ventricule et les « velate » astrocytes, formant une gaine autour des neurones, sont spécifiques des neurones granulaires du cervelet (Emsley & Macklis, 2006). Ceci révèle donc des différences morphologiques inter-régionales (**Figure 5A, B, C**).

Une étude récente révèle également des différences inter-régionales, en particulier dans le cortex somato-sensoriel de souris adulte (**Figure 5D**). Afin d'étudier la structure tridimensionnelle des astrocytes du cortex de souris, les auteurs ont utilisés un modèle de souris transgéniques, les souris *Glast*-EMTB-GFP qui expriment la protéine de liaison aux microtubules Enscosine fusionnée avec la GFP (Green fluorescent protein) et sous contrôle du promoteur astrocytaire *Glast*. Cette étude révèle des différences morphologiques entre les astrocytes des différentes couches du cortex. Les astrocytes des couches superficielles II/III présentent un volume occupé et un nombre d'intersections plus important que les astrocytes des couches profondes IV. L'angle d'orientation des astrocytes des couches superficielles par rapport à la couche piale est de 90° alors qu'il est proche de 0° pour les astrocytes de la couche IV (Lanjakornsiripan et al., 2018) (**Figure 5E, F**).

Il existe également une hétérogénéité morphologique inter-espèces. Chez les primates humains et non-humains, d'autres sous-types morphologiques d'astrocytes ont été décrits comme les astrocytes inter-laminaires et les astrocytes « varicose projection » dans le cortex (Oberheim et al., 2009; Reisin & Colombo, 2002). Chez le furet, l'organisation tridimensionnelle des astrocytes se distingue de celle des astrocytes murins par un chevauchement d'au moins 50 % des domaines de chaque astrocyte (López-Hidalgo et al., 2016). D'autre part, les astrocytes de primates sont plus grands et plus complexes que les astrocytes de rongeurs (**Figure 5G, H, I, J**). Par exemple, les astrocytes protoplasmiques du cortex humain ont un diamètre 2.6 fois plus grand, possèdent 10 fois plus de prolongements GFAP⁺ qui sont 10 fois plus longs que les astrocytes de rongeur. Cela signifie que les astrocytes humains contactent un plus grand nombre de synapses estimé à environ 270 000 à 2 millions de synapses par astrocyte humain (Oberheim et al., 2009).

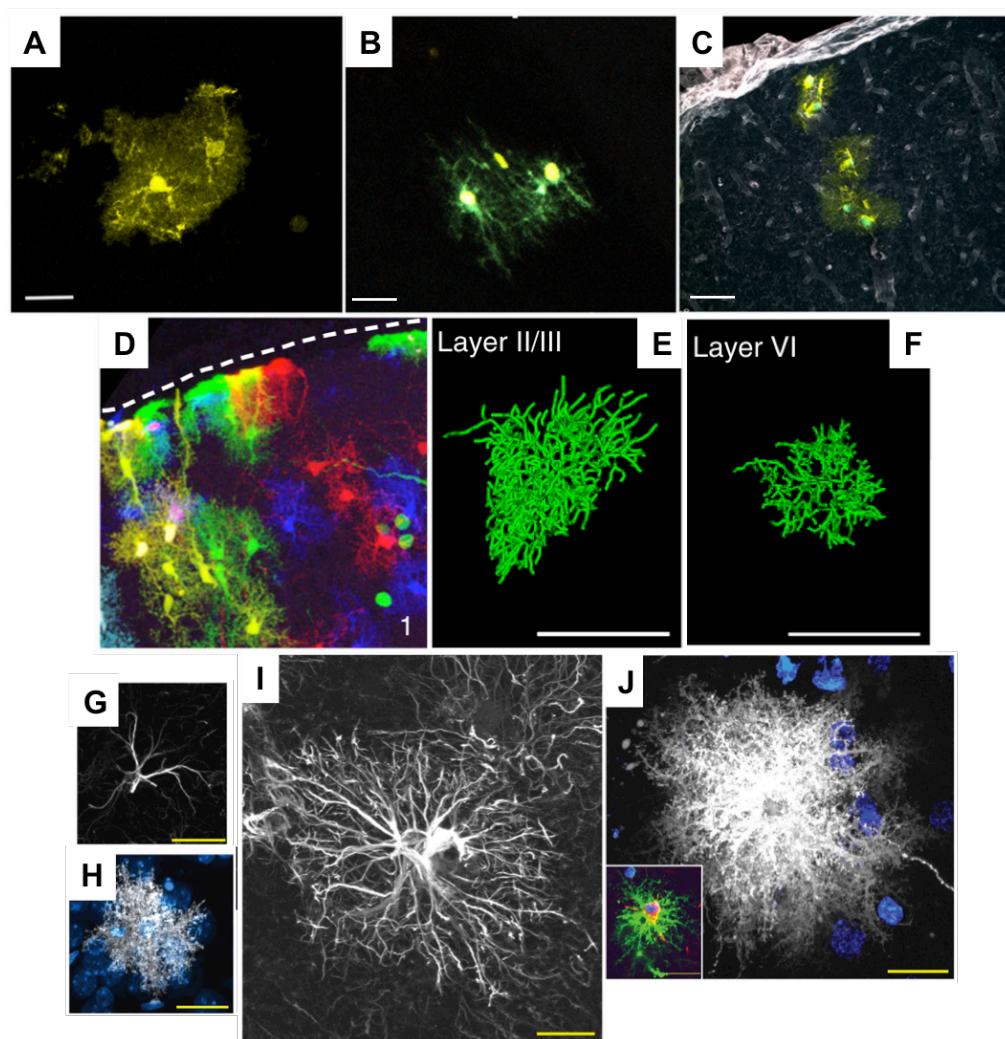


Figure 5. Hétérogénéité morphologique des astrocytes. La morphologie des astrocytes diffère en fonction des régions cérébrales, par exemple, dans la substance grise (A), la substance blanche (B) ou à proximité des vaisseaux de la surface du cerveau (C). (Bribian et al, 2018). Elle diffère aussi dans une même région comme le cortex (D) (Clavreul et al, 2019) où la morphologie des astrocytes des couches superficielles (E) est différente de celle des couches profondes (F) (Lanjakornsiripan et al, 2018). Enfin, d'importantes différences de taille et de complexité sont observées entre les astrocytes murins (G, H) et les astrocytes humains (I, J) (Oberheim et al, 2009).

Ces études soulignent donc la diversité morphologique des astrocytes entre espèces, entre régions ou au sein même d'une région. Les mécanismes qui contrôlent la morphologie des astrocytes sont peu connus mais deux études montrent que la perte de certaines connexines ou neuroligines altère leur morphologie (Pannasch et al., 2014; Stogsdill et al., 2017). Il est également possible que la morphologie diversifiée des astrocytes soit justement liée aux différentes origines développementales évoquées dans le paragraphe précédent (Bribián et al., 2016; Zhang & Barres, 2010).

De manière intéressante, l'hétérogénéité morphologique est associée à une hétérogénéité moléculaire (**Figure 6**) développée dans le paragraphe suivant.

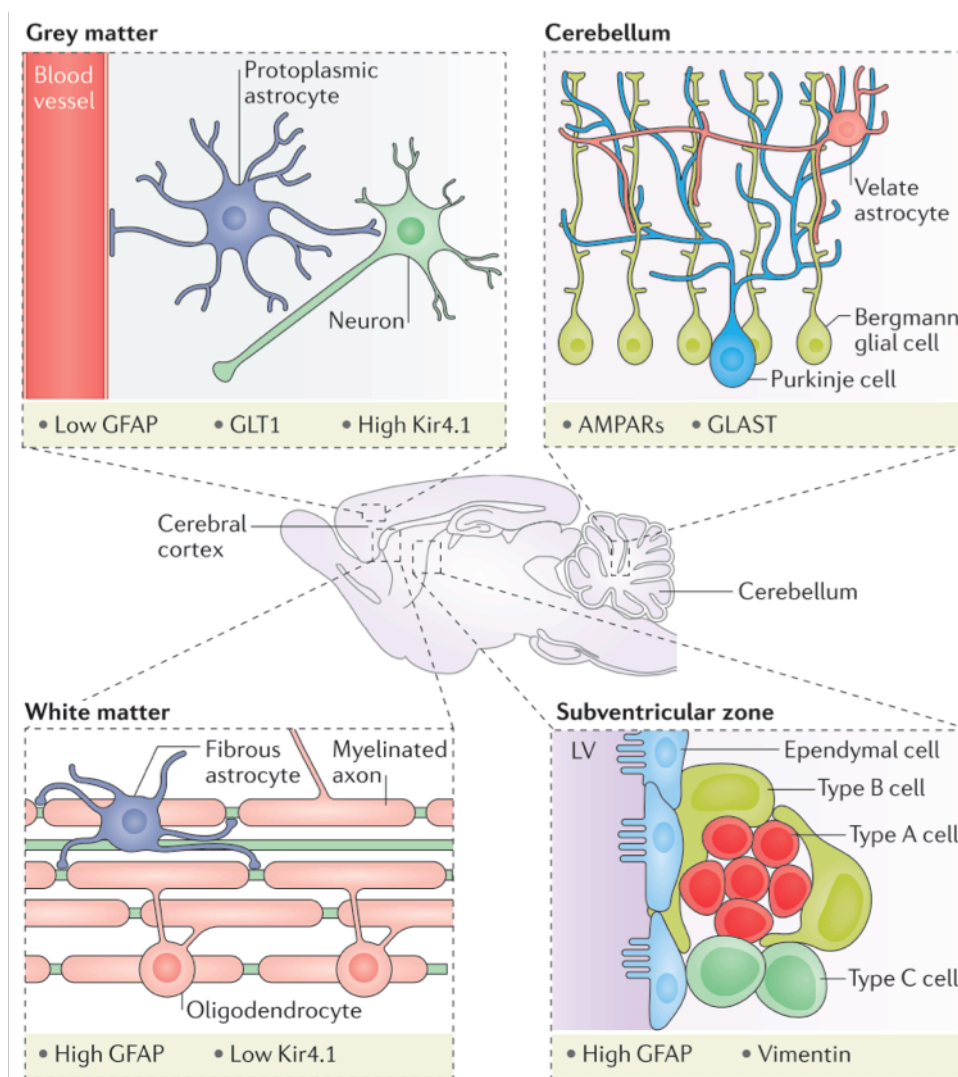


Figure 6. Les astrocytes de différentes régions présentent une hétérogénéité morphologique et moléculaire. Extrait de Ben Haim et al, 2017.

4.3. Diversité moléculaire

Un grand nombre d'études montre aujourd'hui que les astrocytes ne diffèrent pas seulement en terme morphologique mais également en terme d'identité moléculaire.

Ainsi, certaines des différences morphologiques entre les astrocytes sont associées à différents profils d'expression protéiques et une hétérogénéité inter et intra-régionale est observée à l'échelle moléculaire (Doyle et al., 2008; Oberheim et al., 2012) (**Figure 6**).

Une étude récente a comparé le profil moléculaire d'astrocytes entre 6 régions cérébrales dont le cortex et l'hippocampe (Morel et al., 2017). Pour cela, les auteurs ont utilisé la technique de TRAP-seq, chez les souris *Aldh1l1*, qui permet d'isoler les ARNm associés au ribosome afin de les séquencer (TRAP : Translating ribosome affinity purification). Cette étude révèle une hétérogénéité moléculaire entre les ARNm des différentes régions cérébrales (Morel et al., 2017) (**Figure 7A**). Une autre étude comparant les astrocytes de l'hippocampe et du striatum avec une combinaison d'approches comme le RNA-seq et la spectrométrie de masse montre que les astrocytes de ces deux régions ont des profils transcriptomiques et protéiques bien distincts (Chai et al., 2017) (**Figure 7B**).

Parmi les gènes différentiellement exprimés entre les régions cérébrales, on retrouve des gènes impliqués dans les fonctions homéostatiques des astrocytes (**Figure 6**). Par exemple, l'expression de *Kir4.1* varie d'un facteur 5 entre différentes régions du cerveau et est enrichi dans la moelle épinière (Nwaobi et al., 2016; Olsen et al., 2007). En particulier, les astrocytes de la corne ventrale ont une expression de *Kir4.1* plus importante que ceux de la corne dorsale et ces astrocytes sont situés autour des motoneurones de type α (Kelley et al., 2018). Une autre étude confirme l'hétérogénéité de l'expression de *Kir4.1* qui est plus forte dans l'hypothalamus que dans le cervelet par exemple (Boisvert et al., 2018). D'autres gènes sont différemment exprimés entre les régions cérébrales comme les transporteurs *Slc1a2* (GLT1) et *Slc1a3* (GLAST) (paragraphe I.3.5) (Regan et al., 2007) ou *Gja1* (Cx43) enrichi dans l'hippocampe par rapport au thalamus, qui est lui enrichi en *Gjb6* (Cx30) (Griemsmann et al., 2015).

D'autres études révèlent aussi des différences intra-régionales du profil moléculaire des astrocytes. Par exemple, différentes sous-populations d'astrocytes du cortex somatosensoriel ont des profils d'expressions protéiques différents (Houades et al., 2008). En particulier, l'expression des Cx30 et Cx43 est enrichie dans le cortex à tonneaux par rapport aux autres régions du cortex somatosensoriel (Houades et al., 2008). D'autres sous-populations d'astrocytes sont observées dans le bulbe olfactif (Roux et al., 2011) ou dans les couches du cortex (Morel et al., 2019).

Une étude récente a proposé une classification moléculaire des astrocytes (John Lin et al., 2017). Par FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting), 5 sous-populations distinctes d'astrocytes ont été identifiées à travers 5 régions différentes du cerveau. Ces classes expriment des marqueurs moléculaires comme CD (Cluster of differentiation) 51, CD63 et CD71 et la proportion d'expression de ces marqueurs varie au sein d'une même région, témoignant à nouveau d'une hétérogénéité à la fois inter et intra-régionale (John Lin et al., 2017) (**Figure 7E**).

Enfin, l'avènement des techniques de transcriptomique sur cellules uniques a permis de mieux explorer cette diversité moléculaire (Batiuk et al., 2020; Bayraktar et al., 2020; Hirbec et al., 2020; Lake et al., 2018; Zeisel et al., 2018).

L'étude de Batiuk et al (Batiuk et al., 2020) s'est spécifiquement focalisée sur la diversité moléculaire du cortex et de l'hippocampe à l'aide d'un protocole de Smart-Seq2 (Switch Mechanism At the 5' end of RNA Templates) à partir d'astrocytes présélectionnés par tri

magnétique pour leur expression du marqueur de surface ACSA 2 . Ils ont ainsi identifié 5 sous-types d'astrocytes possédant des signatures moléculaires uniques. A l'aide de ces signatures, ils ont identifié la localisation de chaque sous populations par hybridation in situ permettant de détecter une molécule d'ARN unique (smFISH : single molecule fluorescent in situ hybridization). La classe appelée AST1 (Astrocyte subtype) est principalement située dans la couche subpiaie du cortex et dans l'hippocampe, AST2 est répartie dans le cortex, AST3 à la fois dans le cortex et dans l'hippocampe et enfin AST4 et AST5, présentes en faibles proportions, semblent être respectivement exprimées dans la couche sous-granulaire de l'hippocampe et dans le cortex (**Figure 7C**). Cette étude révèle donc à la fois une hétérogénéité moléculaire inter et intra-régionale. Une autre étude récente s'est intéressée à l'hétérogénéité intra-régionale entre les couches du cortex (Bayraktar et al., 2020) en utilisant une technique permettant de quantifier l'expression de plusieurs gènes sur cellules uniques, basée sur du smFISH. Cette étude a révélé des profils moléculaires différents entre les astrocytes des couches superficielles, moyennes et profondes du cortex somatosensoriel (Bayraktar et al., 2020) (**Figure 7D**).

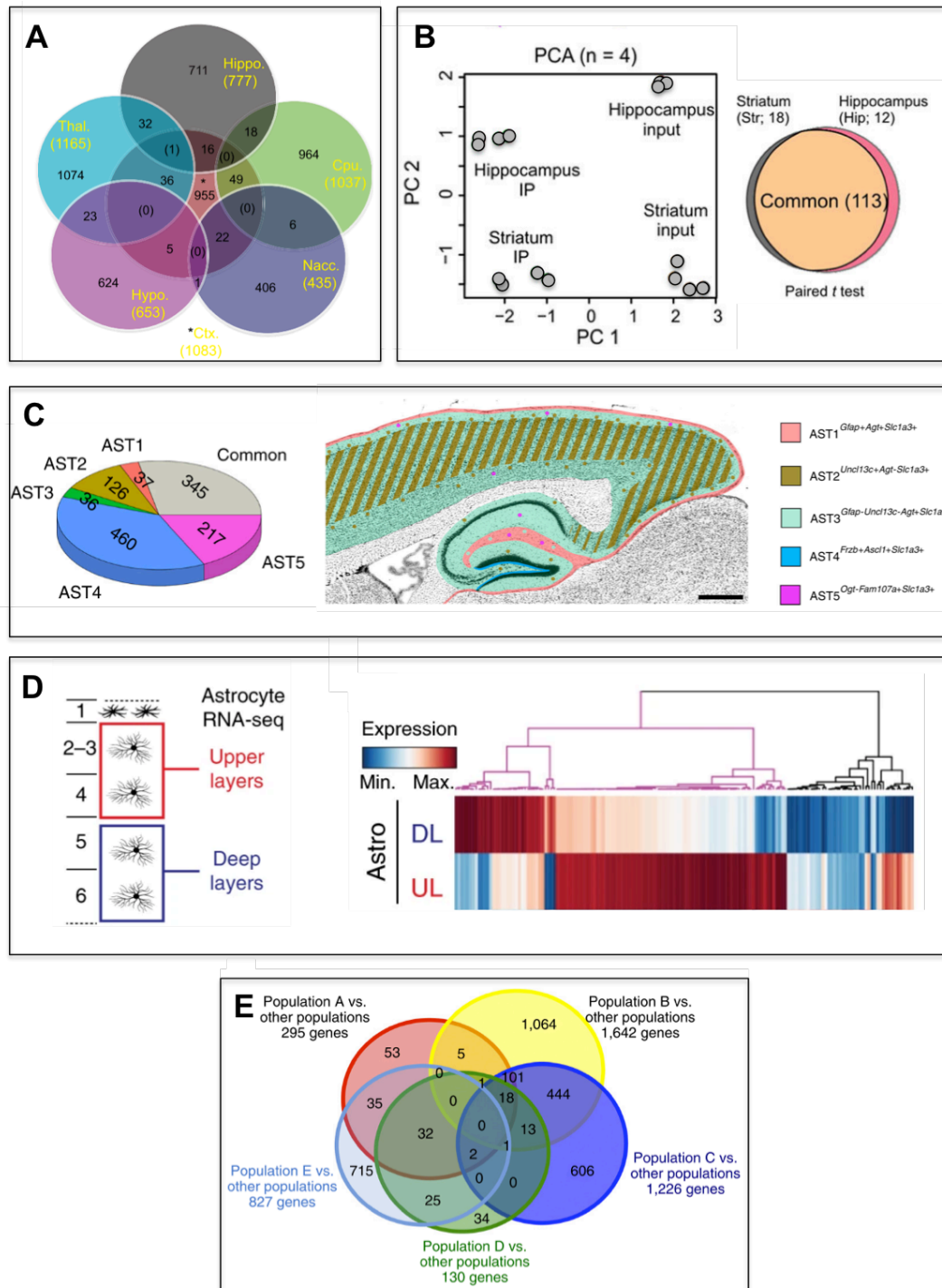


Figure 7. Principales études révélant une hétérogénéité moléculaire des astrocytes. **A.** Représentation en diagramme de Venn de données de RNAseq sur des astrocytes de différentes régions. Chaque région exprime une signature moléculaire spécifique. (Morel et al, 2017). **B.** Analyse en composante principale des gènes les plus variables entre le striatum et l'hippocampe (panneau gauche) et diagramme de Venn des données de protéomique entre les deux régions (panneau droit). Chaque région est associée à une signature transcriptomique et protéique spécifique. (Chai et al, 2017). **C.** Représentation graphique du nombre de gènes enrichis dans chacune des sous-populations d'astrocytes (AST : astrocyte subtypes) (panneau gauche) positionnées de façon spécifique à travers le cortex et l'hippocampe (panneau droit). (Batiuk et al, 2020) **D.** Analyse RNAseq des astrocytes des couches superficielles et profondes du cortex montrant une signature transcriptomique propre à chaque sous-région. (Bayraktar et al, 2020). **E.** Diagramme de Venn du nombre de gènes enrichis dans chacune des populations d'astrocytes (A, B, C, D et E) identifiées dans le cerveau et exprimant différentes combinaisons de marqueurs CD (Cluster of différenciation). Chaque population possède une signature propre. (John Lin et al, 2017).

4.4. Diversité fonctionnelle

Comme décrit dans les paragraphes précédents, les astrocytes présentent une hétérogénéité morphologique et moléculaire, probablement en lien avec des fonctions distinctes, même si peu d'études associent directement ces différents niveaux d'hétérogénéité. Néanmoins, plusieurs études montrent que les astrocytes sont diversifiés au niveau fonctionnel, notamment dans la synaptogénèse, le couplage astrocytaire et la signalisation calcique.

Durant le développement, les astrocytes sont impliqués dans la formation des synapses (paragraphe I.3.4). L'analyse des profils moléculaires entre différentes régions montre que certains gènes différemment exprimés sont associés à des différences fonctionnelles *in vitro* (Buosi et al., 2017; Morel et al., 2017). Dans l'étude de Morel et al., les auteurs mettent en évidence une expression de gènes synaptogéniques comme *SPARC* qui est enrichi dans les astrocytes sous corticaux. De manière intéressante, des études de co-cultures montrent que les astrocytes induisent sélectivement une croissance neuritique et une activation des synapses de neurones provenant de la même région, suggérant une communication neurone-astrocyte région-spécifique (Morel et al., 2017). (Figure 8).

Les astrocytes sont organisés en réseau fonctionnel, leur permettant notamment de faciliter la propagation des signaux calciques, essentiels pour leur fonctionnement (paragraphe I.2.3). Plusieurs études montrent des différences dans cette signalisation et dans le couplage astrocytaire (Figure 8). Par exemple, les signaux calciques déclenchés par une activité locomotrice dans les astrocytes de la glie de Bergmann présentent une dynamique différente par rapport à ceux déclenchés dans les astrocytes du cortex (Nimmerjahn et al., 2009). En condition basale, les oscillations calciques spontanées du cortex de rat anesthésié sont différentes entre les couches corticales (Takata & Hirase, 2008). Dans l'étude de Chai et al comparant les astrocytes du striatum et de l'hippocampe, le remplissage des astrocytes en patch clamp par une molécule diffusible, la biocytine, montre que le couplage astrocytaire et l'activité calcique sont plus importants dans les astrocytes de l'hippocampe par rapport au striatum (Chai et al., 2017). Des différences de couplage sont aussi observées à l'échelle intra-régionale comme dans le cortex à tonneau du cortex somatosensoriel (Houades et al., 2008) ou dans les glomérules du bulbe olfactif (Roux et al., 2011). Une autre étude montre des niveaux de couplage différents entre les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe de rat (D'Ambrosio et al., 1998).

D'autres fonctions présentées dans les parties précédentes sont également variables entre différents astrocytes (Figure 8).

Enfin, les astrocytes présentent également une hétérogénéité fonctionnelle en fonction du circuit neuronal dans lesquels ils sont impliqués. Par exemple, la stimulation de neurones moyen épineux du striatum de la voie striatonigrale ou de la voie striatopallidale entraîne une activation de sous-types d'astrocytes différents (Martín et al., 2015). L'activation de ces différents types d'astrocytes par une activation locale des récepteurs à la dopamine D1 ou D2 est visible par une augmentation du calcium entraînant la libération d'endocannabinoïdes. Ainsi, des sous-types d'astrocytes striataux

semblent spécialisés dans la réponse à l'activation des récepteurs D1 ou D2 (Martín et al., 2015).

L'ensemble de ces études montre que la complexité morphologique et moléculaire des astrocytes sous-tend une partie de leurs fonctions. Les propriétés fonctionnelles des différents sous-types d'astrocytes demeurent en partie inexplorées et la fonction de ces cellules suscite encore de multiples questions.

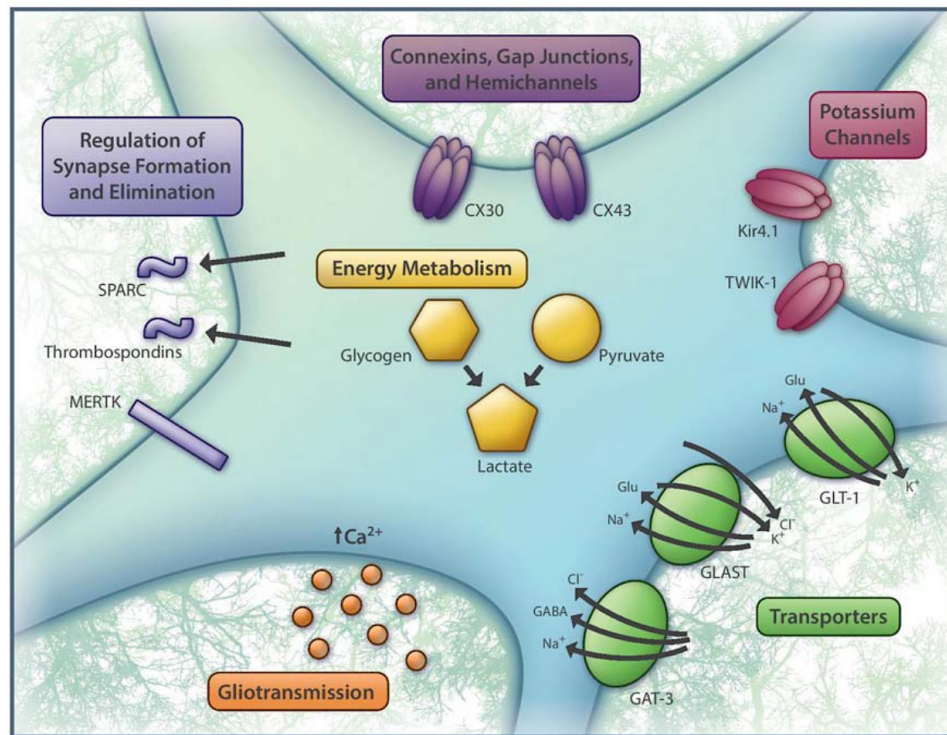


Figure 8. Différentes fonctions des astrocytes sont hétérogènes. Parmi ces fonctions, on retrouve leur organisation en réseau via les Cx, leurs rôles dans le métabolisme, l'homéostasie ionique, la recapture des neurotransmetteurs, la gliotransmission via la signalisation calcique ou encore la régulation de la formation et l'élimination des synapses. Extrait de Xin et al, 2018.

4.5. Approches d'exploration de la diversité des astrocytes

Les outils expérimentaux pour étudier l'hétérogénéité des cellules du SNC ont d'abord été développés pour les neurones et ont permis de mettre en évidence une grande diversité inter et intra-régionale. L'exploration de l'hétérogénéité des astrocytes n'a commencé que bien après et soulève encore aujourd'hui de nombreuses questions. Ce retard dans l'exploration de la diversité des astrocytes s'explique par un manque d'outils expérimentaux adéquats (Khakh & Deneen, 2019).

Cependant, cette question est aujourd'hui examinée et un grand nombre d'études ont rapportées une hétérogénéité de forme et de fonctions entre ou dans une même région (voir paragraphes I.4.) grâce à des approches diverses et originales (Hirbec et al., 2020; Khakh & Deneen, 2019).

La comparaison du transcriptome des astrocytes entre les régions ou au sein de sous régions a été utilisée pour analyser l'hétérogénéité moléculaire. Il est nécessaire d'isoler les astrocytes pour analyser spécifiquement leur transcriptome. Certaines études ont utilisés des souris transgéniques exprimant une protéine fluorescente de façon ubiquitaire dans les astrocytes comme les souris Aldh111-GFP (Lanjakornsiripan et al., 2018) ou EAAT2-TdTomato (Morel et al., 2019). L'isolation des astrocytes peut ensuite être réalisée par FACS (Morel et al., 2017, 2019) ou par microdissection laser (Lanjakornsiripan et al., 2018). D'autres ont utilisé la technique de TRAP pour étudier les ARNm activement traduits dans les astrocytes (Boisvert et al., 2018; Chai et al., 2017; Morel et al., 2017). Les transcriptomes sont ensuite établis par des approches de RNA-seq. Le RNA-seq sur cellules uniques est aujourd'hui une technique de choix pour étudier la diversité des astrocytes à l'échelle moléculaire. (Batiuk et al., 2020). Les études transcriptomiques permettent d'identifier des gènes candidats de sous-populations qui sont ensuite validés *in situ* par immunohistochimie ou par smFISH en particulier via la technique du RNAscope (Batiuk et al., 2020). Des études ont d'ailleurs développés des techniques d'analyses spatiales à grande échelle basées sur le smFISH (Bayraktar et al., 2020). Des études fonctionnelles peuvent ensuite être réalisées avec des approches de perte et de gain de fonctions.

Enfin, pour éviter les biais potentiels de l'utilisation d'un seul marqueur pour identifier les astrocytes, certaines études utilisent une combinaison de marqueurs pour caractériser des sous-populations. Certains marqueurs de surface ont par exemple été utilisés en FACS (John Lin et al., 2017). L'apparition de nouvelles techniques comme l'électrolocation *in utero* de transgènes Brainbow permet le marquage et le traçage de différents progéniteurs neuraux (technique MAGIC) pour visualiser des clones astrocytaires individuels (Bribián et al., 2016; Clavreul et al., 2019; Loulier et al., 2014).

Le développement de nouvelles stratégies et la combinaison de techniques complémentaires permet ainsi d'étudier l'hétérogénéité des astrocytes mais il reste nécessaire de développer de nouveaux outils qui ciblent des sous-populations spécifiques d'astrocytes afin d'étudier leurs fonctions.

II. Les astrocytes deviennent réactifs en conditions pathologiques

1. Définition et nomenclature

En plus de leurs nombreux rôles en conditions physiologiques (paragraphe I.3), les astrocytes sont capables de réagir face à un stimulus dérégulant l'homéostasie du SNC. Ces stimuli sont d'une grande variété et les astrocytes réagissent à la fois en cas de stimuli pathologiques aigus (traumatisme cérébral, lésions mécanique du cerveau ou de la moelle, ischémie, infection, épilepsie) mais aussi chroniques comme dans les cancers et les maladies neurodégénératives (MND) (Ben Haim et al. 2015a; Liddelow & Barres, 2017; Sofroniew & Vinters, 2010). Les astrocytes réagissent donc dans des conditions pathologiques variées mais aussi chez de nombreuses espèces de mammifères, certains amphibiens, oiseaux, poissons et même la drosophile (Ben Haim et al, 2015 ; Freeman, 2015; Freeman & Rowitch, 2013). Les premiers travaux de Chaslin et Ramon y Cajal rapportaient déjà des changements dans les astrocytes en conditions pathologiques. En particulier, ils ont observé des changements morphologiques et histologiques avec une augmentation des structures fibrillaires et des éléments cellulaires plus nombreux (Chaslin, 1891 ; Ramon y Cajal, 1925) (**Figure 9**). De multiples nomenclatures et des définitions variées ont par la suite été utilisées pour décrire ce processus et ces changements dans les astrocytes. Dans une revue récente à laquelle j'ai participé (Escartin et al., 2019), **annexe 1**, nous avons réalisé un sondage auprès d'une quarantaine de chercheurs travaillant sur les astrocytes afin de mieux définir la terminologie utilisée et la définition de ce processus. Dans le paragraphe suivant, je ne reprendrai que les principaux concepts de cette revue (pour plus de détails, voir la revue en **Annexe 1**).

Parmi les noms variés utilisés pour décrire le processus de changements des astrocytes, on retrouve : réactivité des astrocytes, astrogliose, activation des astrocytes, gliose réactive, astrocytose. Les termes de gliose réactive, astrocytose et astrogliose impliquent la notion de prolifération des astrocytes et finalement, dans la plupart des modèles de maladies, les astrocytes ne prolifèrent pas (paragraphe II.4.5.). Le terme d'activation des astrocytes peut être source de confusion avec une activation physiologique comme le déclenchement d'une signalisation calcique suite à une activité neuronale normale. Nous utiliserons donc les termes de réactivité astrocytaire en parlant du processus et en précisant le contexte (exemple : réactivité astrocytaire dans la maladie d'Alzheimer, MA) et d'astrocytes réactifs pour parler des cellules. Ces termes correspondent à la réponse des astrocytes à toutes conditions pathologiques dans le SNC (Escartin et al., 2019).

La diversité des réponses recensées concernant la définition de la réactivité astrocytaire montre que ce phénomène reste mal défini et sujet à controverse. Néanmoins, les chercheurs s'accordent sur une définition qui pourrait être résumée ainsi : « les astrocytes

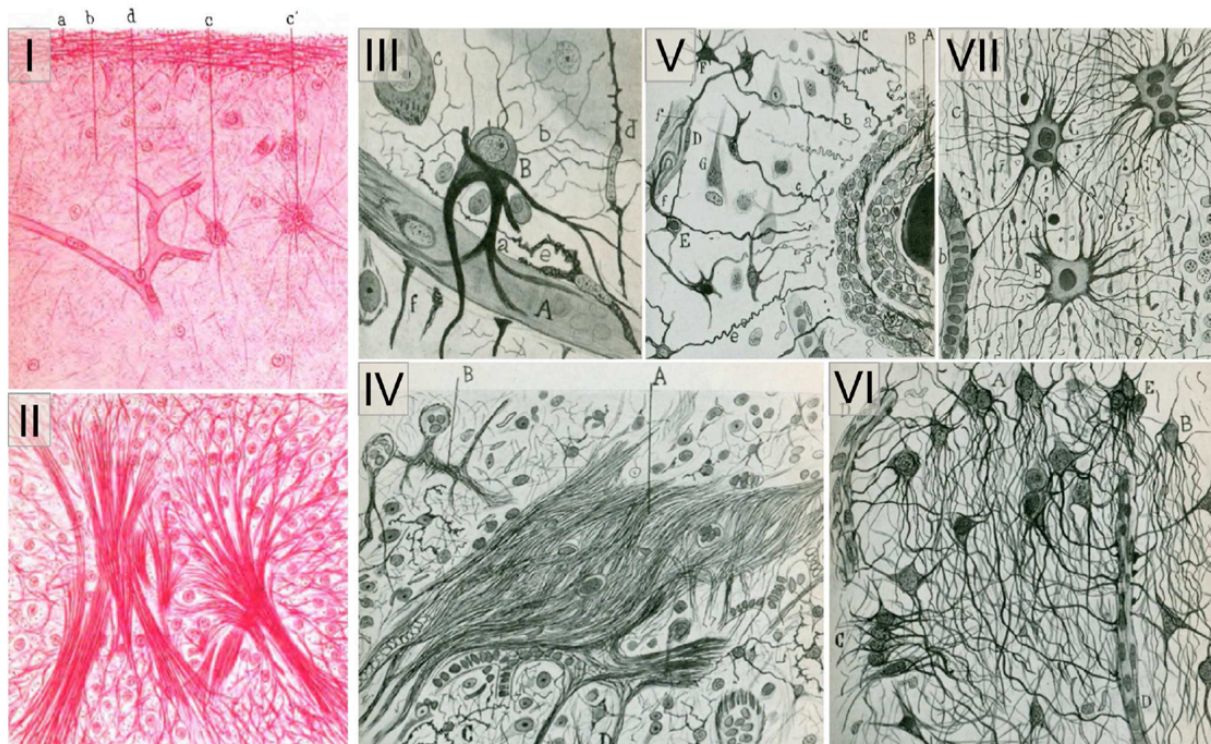


Figure 9. Dessins originaux d'astrocytes réactifs dans le cerveau humain par Chaslin (I, II) et Ramon y Cajal (III à VII). I, II. Dessins de coupe corticale non lésée (I) et d'un patient épileptique avec une accumulation de noyaux et une augmentation des structures fibrillaires qui correspondent aux filaments intermédiaires des astrocytes réactifs (II). (Chaslin et al, 1891). III à VII. Dessins de coupes corticales (III à VI) et de cervelet (VII) d'un patient souffrant de paralysie cérébrale progressive. Ces dessins montrent un astrocyte réactif avec des prolongements épais polarisants vers un vaisseau sanguin (III), d'importants faisceaux de fibres gliales (IV), des astrocytes réactifs avec des prolongements en spirale (V), des astrocytes réactifs avec de nombreux prolongements polarisés et superposés les uns aux autres (VI) et enfin, des astrocytes hypertrophiques et multi-nucléés du cervelet (VII). (Ramon y Cajal et al, 1925). Extrait de Escartin et al, 2019.

détectent et répondent à une situation anormale dans le cerveau. Ils changent au niveau morphologique, biochimique, transcriptionnel et fonctionnel. Ces changements sont maintenus tant que les stimuli pathologiques sont présents mais certains aspects peuvent être réversibles. Les astrocytes réactifs sont hétérogènes et peuvent avoir des effets variés sur la progression de la maladie » (Escartin et al., 2019). Cette définition soulève donc différents aspects de la réactivité astrocytaire qui sont détaillés dans les paragraphes suivants.

2. Caractéristiques des astrocytes réactifs

2.1. Les astrocytes réactifs présentent des changements morphologiques

En conditions pathologiques, les astrocytes présentent des changements morphologiques de type hypertrophie du soma et des prolongements (Liddelow & Barres, 2017; Wilhelmsson et al., 2006a) (**Figure 10A, B, C, D, E, F**). La réactivité peut également entraîner un réarrangement de l'arborisation astrocytaire avec une augmentation (ou une réduction !) du nombre de prolongements primaires et une polarisation vers le site lésionnel (Bardehle et al., 2013; Wilhelmsson et al., 2006b). L'organisation des astrocytes en domaine n'est pas modifiée par la réactivité (Wilhelmsson et al., 2006b) sauf dans des conditions pathologiques sévères comme l'épilepsie (**Figure 10G**) ou les astrocytes rétractent leurs prolongements fins, deviennent asymétriques et présentent des prolongements chevauchants entre les différents territoires (Oberheim et al., 2008). Cette désorganisation est également observée dans le cas extrême de la cicatrice gliale, provoquée par la réaction des astrocytes à une rupture du parenchyme cérébral. Ils adoptent alors une forme allongée avec des prolongements enchevêtrés et forment une barrière compacte autour de la lésion qui isole le parenchyme sain (Anderson et al., 2016; Burda & Sofroniew, 2014; Wanner et al., 2013a). Le rôle de cette cicatrice gliale reste débattu et ne sera pas développé dans ce manuscrit (voir (Sofroniew, 2018) pour une revue sur le sujet).

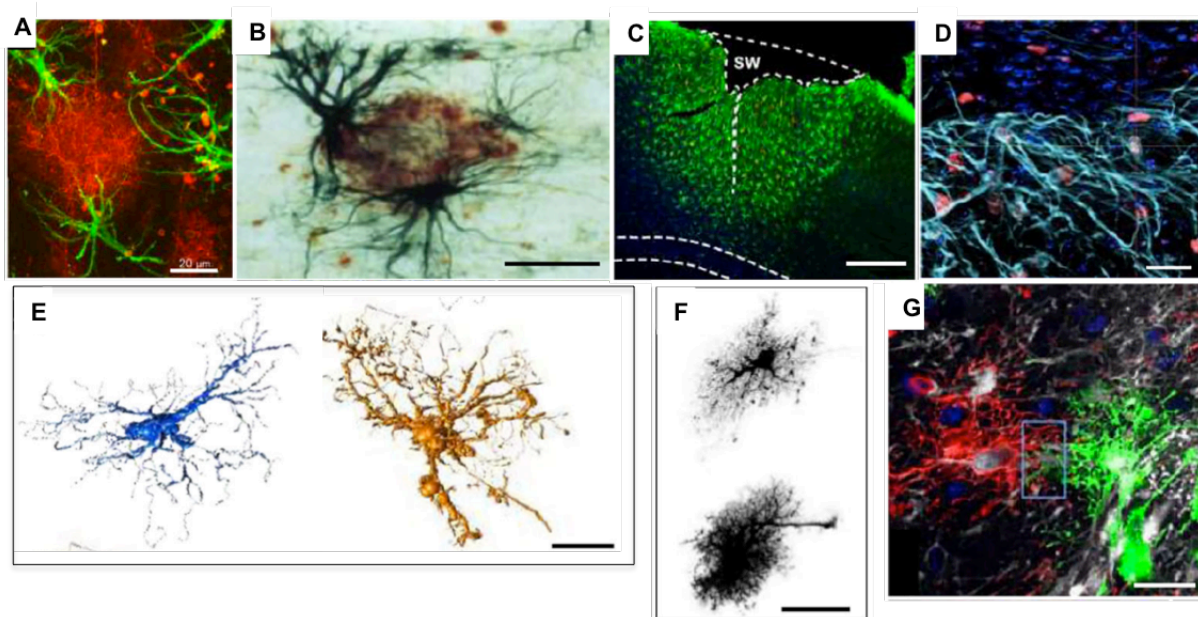


Figure 10. Caractéristiques des astrocytes réactifs. Les astrocytes deviennent réactifs dans de nombreuses espèces et conditions pathologiques comme au cours de la MA (A, B) ou dans des modèles de lésion du cortex (C) et de la moelle (D). Cette réponse est caractérisée par une hypertrophie du soma et des prolongements (E, F). Dans certaines conditions extrêmes comme l'épilepsie, l'organisation des astrocytes en domaine peut être perturbée (G). A. Astrocytes réactifs (vert) autour d'une plaque amyloïde (rouge) dans l'hippocampe de souris modèle de la MA. (Olabarria et al, 2010). B. Astrocytes réactifs (noir) autour d'une plaque amyloïde (marron) dans l'hippocampe de patients atteints de la MA. (Pike et al, 1995). C. Coupe de cortex frontal de souris marquée avec la GFAP après une lésion du cortex. (Frik et al, 2018). D. Immunofluorescence GFAP (cyan, astrocytes réactifs), BrdU (rouge, astrocytes en prolifération) dans la moelle épinière de souris après une lésion de la moelle. (Wanner et al, 2013). E. Morphologie reconstituée en 3D d'un astrocyte non réactif (bleu) et d'un astrocyte réactif induit par l'exposition au CNTF dans le striatum de rat (jaune). (Ligneul et al, 2019). F. Astrocytes du cortex de souris dialysés avec la sonde Lucifer Yellow en condition normale (haut) et après une lésion corticale (bas) (Wilhelmsson et al, 2006). G. Astrocytes GFP⁺ (blanc) marqués avec des traceurs lipophiliques (vert et rouge) dans le cortex de souris épileptique. (Oberheim et al, 2008). L'ensemble de ces images montre à la fois la diversité de la réactivité astrocytaire et l'universalité de cette réponse entre différentes conditions pathologiques et différentes régions cérébrales.

2.2. Les astrocytes réactifs sont associés à d'importants changements moléculaires

Une autre caractéristique clé de la réactivité astrocytaire est la surexpression de protéines des filaments intermédiaires comme la GFAP (Eng, 1985), la vimentine ou la nestine. L'augmentation des ARNm et de la protéine GFAP ont été rapportés dans de multiples modèles de lésions et situations pathologiques dans le SNC, y compris chez les patients (Fuchs & Cleveland, 1998; Liddel & Barres, 2017; Sofroniew & Vinters, 2010) à l'aide de différentes techniques. Par exemple, dans les études transcriptomiques d'astrocytes réactifs, la *Gfap* est quasiment systématiquement induite (Hol & Pekny, 2015; Liddel & Barres, 2017; Orre, et al., 2014a; Osborn et al., 2016; Zamanian et al., 2012). De plus, l'augmentation de l'expression de la GFAP est une réponse précoce chez

les patients après une lésion ou dans la MA par exemple (Carter et al., 2019; González-Reyes et al., 2017). Ces observations valident l'utilisation de ce marquage pour définir et caractériser les astrocytes réactifs, même si il existe quelques limitations qui seront discutées plus loin dans le paragraphe II.4.7.

En plus de la *Gfap*, la réactivité astrocytaire est accompagnée de changements transcriptionnels importants, plus récemment identifiés. Des études transcriptomiques ont montré que plus d'une centaine de gènes sont modifiés dans les astrocytes réactifs de différents modèles ou patients MA (Ceyzeriat et al., 2018; Orre, et al., 2014a; Sekar et al., 2015) mais également dans la sclérose en plaques (SEP) (Itoh et al., 2018), dans des modèles de lésion de la moelle épinière (Anderson et al., 2016) ou du cortex (Sirko et al., 2015), d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne ou d'injection de lipopolysaccharide (LPS) (Zamanian et al., 2012). En particulier, parmi les gènes régulés positivement, *Serpina3n* et la lipocaline 2 (*Lcn2*) ont été identifiés comme des marqueurs de la réactivité (Zamanian et al., 2012).

Ainsi, les astrocytes subissent d'importants changements au cours de la réactivité, traduits au niveau morphologique et transcriptomique. Ces changements sont étroitement liés aux changements fonctionnels, que je décrirai plus particulièrement dans le contexte de la MA (paragraphe III.2).

2.3. La réactivité astrocytaire est une réponse persistante et réversible

Comme décrit dans la définition consensus issue de notre enquête (Escartin et al., 2019), « les changements dans les astrocytes réactifs sont maintenus tant que les stimuli pathologiques sont présents mais certains aspects peuvent être réversibles », impliquant des notions de temps et de réversibilité de la réponse.

Les premiers changements moléculaires dans les astrocytes réactifs sont détectés rapidement. Dans différents modèles de lésions du striatum par des neurotoxines, l'ARNm *Gfap* est induit 6h après l'injection et 12 à 72h après au niveau protéique en fonction des neurotoxines utilisées. L'augmentation de la GFAP est donc une réponse précoce après une lésion. La réactivité astrocytaire correspond à un changement d'état des astrocytes qui peut persister plusieurs années dans le cas de MND, contrairement à une activation « physiologique » des astrocytes, en particulier, de leur signalisation calcique, qui peut se faire de manière très transitoire en réponse à la libération de glutamate par exemple (Araque et al., 2014).

La réactivité astrocytaire est une réponse réversible. Une étude récente montre que la greffe d'astrocytes réactifs dans la moelle épinière de souris normale est suffisante pour réduire l'état réactif des astrocytes greffés (Hara et al., 2017). Une autre étude montre qu'une élévation modérée de la pression intraoculaire dans le nerf optique entraîne une réactivité astrocytaire réversible lorsque le stimulus lésionnel est arrêté (Sun et al., 2013). Ces résultats suggèrent que les astrocytes réactifs sont plastiques et régulés par des signaux de leur environnement. Plusieurs signaux ont été montrés comme impliqués dans le maintien de l'état normal des astrocytes ou dans leur désactivation comme la signalisation FGF (Fibroblast growth factor) (Kang et al., 2014), β 1-intégrine (Hara et al., 2017),

TGF α (Rothhammer et al., 2018) , SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling) (Ceyzériat et al., 2018) ou SHH (Garcia et al., 2010).

3. Cascades de signalisation impliquées dans la réactivité astrocytaire

3.1. Signaux déclencheurs de la réactivité

En conditions pathologiques, une grande variété de signaux moléculaires, produits par différents types cellulaires comme la microglie, les cellules endothéliales, les leucocytes ou les neurones en souffrance, sont générés. Les astrocytes sont capables de détecter ces changements de l'environnement grâce à la complexité de leur répertoire en récepteurs et voies de signalisations intracellulaires (Buffo et al., 2010; Burda & Sofroniew, 2014). Une fois détectés, ces signaux déclenchent ou modulent la réactivité mais la distinction entre signaux activateurs et modulateurs reste encore aujourd'hui mal établie. Les signaux pathologiques impliqués dans la réactivité sont très denses et le paragraphe suivant n'en présente qu'un résumé non exhaustif (pour plus de détails, voir revues (Burda & Sofroniew, 2014; Cunningham et al., 2019; Kang & Hébert, 2011)).

Parmi les signaux pathologiques détectés par les astrocytes, on retrouve des signaux extracellulaires comme les purines/pyrimidines et les cytokines, d'ailleurs considérés comme déclencheurs initiaux de la réactivité (Buffo et al., 2010; Burda & Sofroniew, 2014). Certaines cytokines comme le TNF- α (Tumor necrosis factor), l'IL1- β (interleukine) et l'interféron- γ , principalement libérées par la microglie activée, pourraient activer les astrocytes et orienter leurs profils transcriptionnels vers une réponse pro-inflammatoire (Hamby et al., 2012; Zamanian et al., 2012).

De manière intéressante, les astrocytes expriment aussi des PRR (Pattern recognition receptors) capables de détecter des protéines agrégées comme l'A β et la protéine Tau hyperphosphorylée (Heneka et al., 2014; Wyss-Coray et al., 2003). Ces protéines anormales sont alors détectées par les astrocytes et peuvent les activer. On parle de signaux DAMP (Danger-associated molecular patterns) bien décrits dans la microglie mais leurs rôles dans les astrocytes restent méconnus (Heneka et al., 2014). Les PRR sont aussi capables de détecter ces protéines agrégées au niveau intracellulaire (Cunningham et al., 2019).

Plus récemment, il a été montré que l'interaction avec la matrice extracellulaire via les récepteurs aux intégrines jouait un rôle dans la réactivité (Cunningham et al., 2019; Lagos-Cabré et al., 2017). Enfin, les astrocytes sont aussi sensibles aux polluants environnementaux (Wheeler et al., 2019) et aux changements des propriétés mécaniques (Moeendarbary et al., 2017), notamment autour des plaques amyloïdes (Velasco-Estevez et al., 2018).

Une fois détectés par les astrocytes, les nombreux signaux pathologiques entraînent l'activation de voies de signalisations intracellulaires. De nombreuses voies sont impliquées dans la réactivité astrocytaire au cours des MND comme la voie NF- κ B (Nuclear factor kappa B), la voie JAK2-STAT3 (Janus kinase 2-Signal transducer and activator of transcription 3), la voie des MAPK (Mitogen-activated protein kinases) et la

voie calcineurine CN (Ca^{2+} /calmoduline-dependant serine/thréonine phosphatase)/NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) (Buffo et al., 2010; Ben Haim et al., 2015b; Kang & Hébert, 2011) (Figure 11). Cependant, la voie JAK2-STAT3 joue un rôle prédominant dans la réactivité astrocytaire dans plusieurs maladies, agissant comme un master régulateur de la réactivité (Ceyzériat et al., 2016; Ben Haim et al., 2015b).

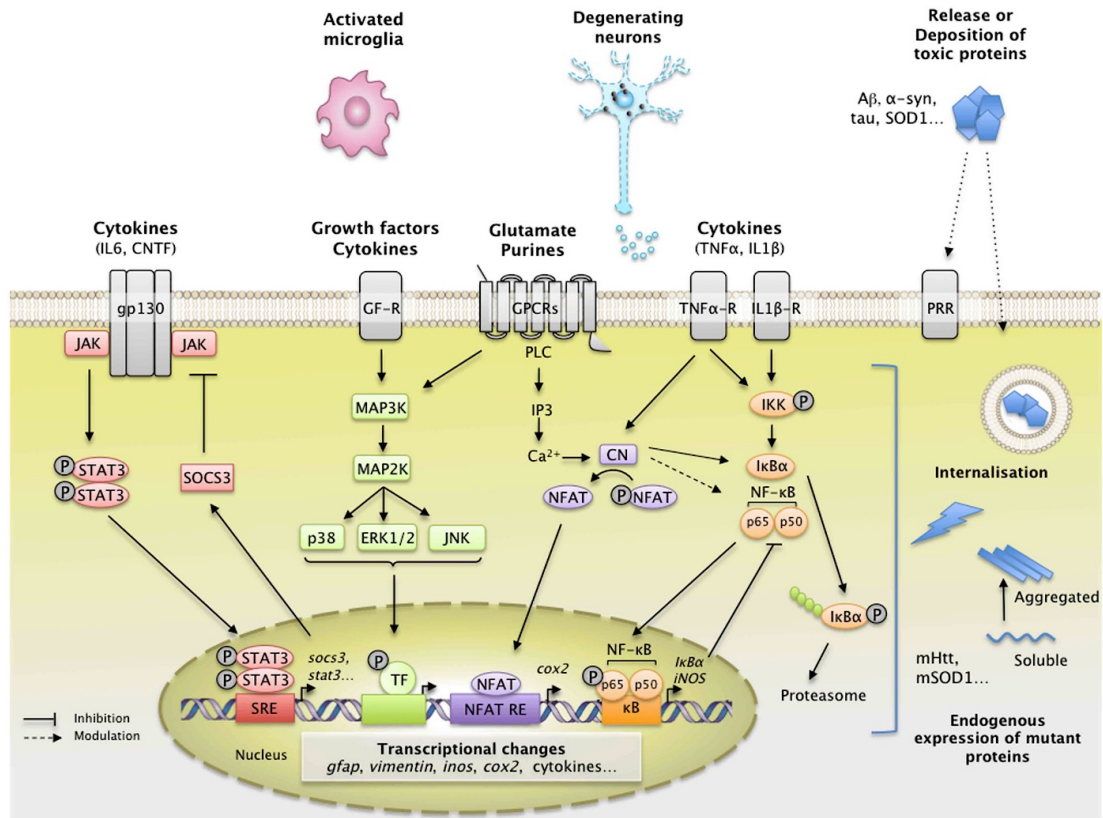


Figure 11. Principaux stimuli et voies de signalisation impliquées dans l'induction et la régulation de la réactivité astrocytaire dans les MND. Les voies de signalisation JAK2-STAT3 (rouge), MAPK (vert), CN/NFAT (violet) et NF-κB (orange) sont activées par différents signaux provenant des neurones, de la microglie et des astrocytes dysfonctionnels. Par l'intermédiaire des PRR, les protéines agrégées peuvent aussi activer ces voies. Extrait de Ben Haim et, 2015b.

3.2. Voie de signalisation JAK2-STAT3

Description générale de la voie

La voie JAK2-STAT3 est une voie de signalisation ubiquitaire, largement conservée entre espèces, qui appartient à la grande famille JAK-STAT comprenant 4 JAK et 7 STAT (Ceyzériat et al., 2016; Darnell et al., 1994; Decker & Kovarik, 2000). Elle est impliquée dans la transcription de gènes cibles régulant un grand nombre de fonctions au cours du développement comme la croissance cellulaire, la prolifération et la différenciation (Ceyzériat et al., 2016; Mertens & Darnell, 2007). Chez l'adulte, cette voie est majoritairement responsable de la signalisation des cytokines et régule donc

l'inflammation. La voie JAK2-STAT3 est aussi impliquée dans des fonctions non canoniques comme le maintien des faisceaux de microtubules, l'autophagie ou la production d'énergie (Ceyzériat et al., 2016; Mertens & Darnell, 2007). La voie est activée par différents signaux comme des facteurs de croissances, des hormones ou des cytokines de la famille des IL (Mertens & Darnell, 2007) (**Figure 12**). La fixation de ces signaux sur les récepteurs entraîne des changements conformationnels de ces derniers, rapprochant ainsi les domaines kinases des JAK2 associées au récepteur qui sont alors capables de se phosphoryler entre elles (Brooks et al., 2014). Les JAK2 phosphorylées recrutent le facteur de transcription STAT3 pour le phosphoryler sur la Tyrosine 705 (Lim et al., 2006). Des dimères de STAT3 phosphorylé s'accumulent dans le noyau où il se lie à des séquences SRE (STAT3 responsive element) sur le promoteur de gènes cibles (Darnell, 1997). Parmi ces gènes cibles, on trouve la *GFAP*, *Vimentine*, *SOCS3* et *STAT3* lui même (**Figures 11 et 12**). Il est aussi intéressant de noter que STAT3 peut être activé par des cascades de signalisation alternatives liées par exemple aux RCPG (récepteur couplé aux protéines G). Il est aussi capable de former des hétérodimères avec d'autres STAT comme STAT1 ou encore être pré-dimérisé avant son activation par JAK2. Enfin, STAT3 est sujet de nombreuses modifications post-traductionnelles qui régulent probablement son activité et son interaction avec des partenaires cellulaires (Ceyzériat et al., 2016; Mertens & Darnell, 2007).

Plusieurs inhibiteurs de la voie ont été identifiés comme les SOCS et les PIAS (Protein inhibitors of activated STAT) (Heinrich et al., 2003). L'inhibition de la voie par les SOCS se fait par ubiquitination des JAKs dégradés ensuite par le protéasome ou bien par inhibition directe de l'activité kinase des JAKs (Babon et al., 2014). En particulier, SOCS3 est capable de se lier simultanément à JAK2 et au récepteur et agir comme un pseudo-substrat pour JAK2 (Kershaw et al., 2013). Il s'agit donc de l'inhibiteur le plus efficace et spécifique de la voie. SOCS3 est un gène cible de la voie et effectue donc un rétrocontrôle (**Figures 11 et 12**).

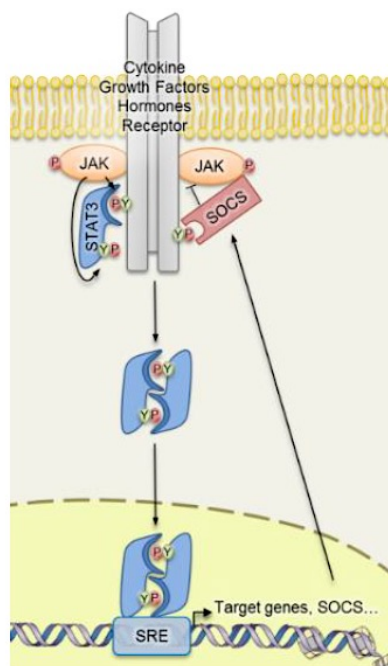


Figure 12. La voie JAK2-STAT3. La fixation de signaux comme des cytokines au récepteur active la kinase JAK2 par phosphorylation. JAK2 active à son tour STAT3 qui s'accumule sous forme de dimères dans le noyau pour réguler la transcription de gènes cibles comme *Gfap* ou *SOCS3*, l'inhibiteur endogène de la voie. Extrait de Ceyzériat et al, 2016.

Rôle dans la réactivité

L'implication de la voie JAK2-STAT3 dans la réactivité a été initialement décrite dans des modèles de lésions aiguës, en particulier au cours de la formation de la cicatrice gliale (Herrmann et al., 2008). Depuis, plusieurs études ont montrées que cette voie était activée dans les astrocytes réactifs de plusieurs modèles de lésion de la moelle ou du cortex (Chen et al., 2018; Oliva et al., 2012), dans l'ischémie (Cheng et al., 2019) ou l'épilepsie (Han et al., 2018).

Dans les MND, notre équipe a montré que la voie JAK2-STAT3 était activée dans les astrocytes réactifs au cours de la MA ou dans des modèles murins et primates de la maladie de Huntington (Ben Haim, et al., 2015b). En particulier, nous avons montré que son activation est nécessaire pour l'induction de la réactivité dans ces modèles. D'autres études ont montré une activation de la voie dans la maladie de Parkinson (Choi et al., 2018), la SEP (Lu et al., 2013) ou la SLA (Sclérose latérale amyotrophique) (Ohgomori et al., 2017).

Plusieurs stratégies ont été utilisées pour inhiber cette voie de signalisation dans les astrocytes réactifs, y compris la notre, et l'ensemble de ces études montre une diminution de la réactivité associée à une amélioration des déficits fonctionnels de la MA (Ben Haim, et al., 2015b; Reichenbach et al., 2019) (voir paragraphe III.3).

La voie JAK2-STAT3 est donc centrale dans les processus de réactivité dans de multiples pathologies et modèles. Cependant, d'autres voies sont aussi impliquées dans la réactivité astrocytaire et sont détaillées dans les paragraphes suivants.

3.3. Voie de signalisation NF- κ B

Description générale de la voie

La voie NF- κ B est une autre voie de signalisation ubiquitaire impliquée dans de nombreuses fonctions comme la réponse immunitaire, l'inflammation, la division cellulaire et l'apoptose (Lian et al., 2016b; Zhang et al., 2017). De manière intéressante, dans le SNC, cette voie est impliquée dans la synaptogenèse, l'apprentissage et la mémoire (Gutierrez & Davies, 2011). Elle est activée par différentes cytokines comme l'IL-1, le TNF- α et le LPS et des facteurs de croissance (Lian et al., 2016b) (**Figures 11 et 13**). Ces ligands se fixent sur leurs récepteurs de surface spécifiques, ce qui entraîne l'activation du complexe IKK (I κ B kinase) par phosphorylation. La kinase IKK va alors phosphoryler I κ B α , l'inhibiteur de la voie. Lorsqu'il est phosphorylé, I κ B α est dégradé par le protéasome et les sous-unités du complexe NF- κ B (principalement p50 et p50) s'accumulent au noyau ou elles se lient à des séquences NRE (NF- κ B response element) sur le promoteur de gènes cibles (Dong et al., 2009). Parmi ces gènes cibles, on trouve des cytokines pro-inflammatoires ou I κ B α lui-même, agissant comme un rétrocontrôle de la voie (**Figure 13**). Il est aussi intéressant de noter que d'autres voies entraînent la translocation du complexe NF- κ B au noyau, par exemple l'activation du récepteur TLR4 (Toll like receptors) par le LPS.

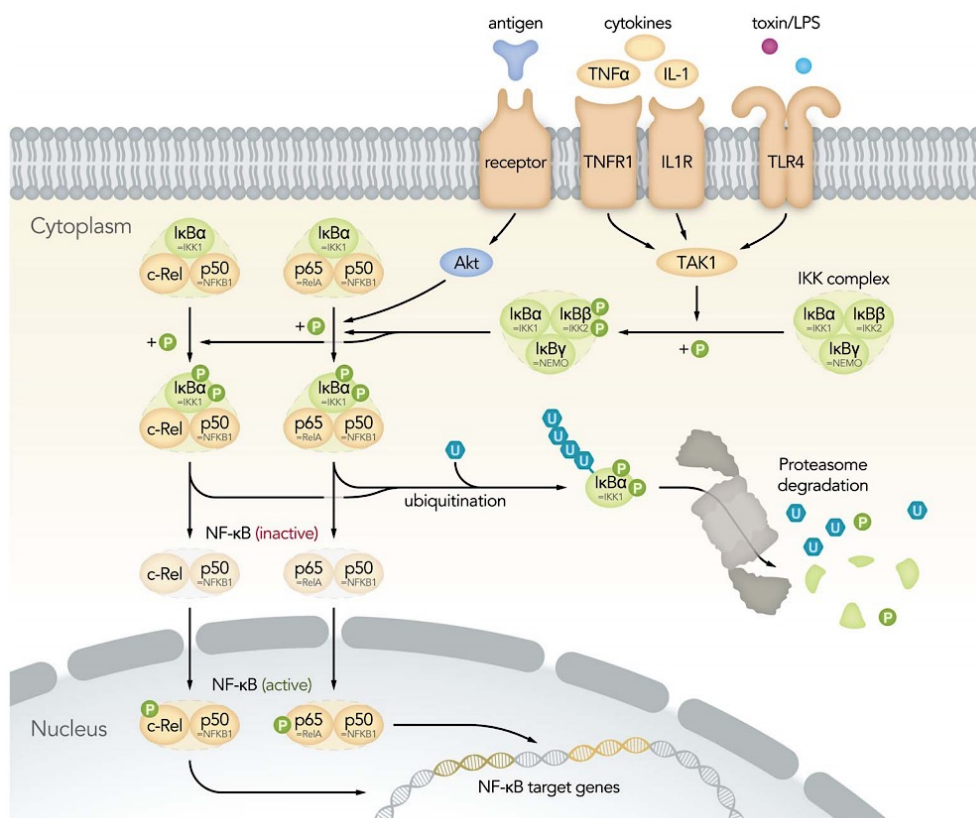


Figure 13. La voie NF- κ B. La fixation de signaux comme des cytokines et des facteurs de croissance à leurs récepteurs spécifiques active le complexe IKK par phosphorylation qui à son tour phosphoryle I κ B α , entraînant sa dégradation. Les principales sous unités du complexe NF- κ B, p50 et p50, sont libérées et s'accumulent au noyau pour réguler la transcription de gènes cibles comme des cytokines pro-inflammatoires. Extrait de Brücher et al, 2019.

Rôle dans la réactivité

La voie NF- κ B est activée au cours des MND, notamment dans la MA où NF- κ B (p65) s'accumule dans les noyaux des astrocytes et des neurones, particulièrement autour des plaques amyloïdes (Kaltschmidt et al., 1997, 2005). Des expériences *in vitro* montrent d'ailleurs que la voie est activée par le peptide A β , dans les astrocytes, la microglie et les neurones (Kaltschmidt et al., 1997; Lian et al., 2015). La voie NF- κ B est aussi activée dans les astrocytes réactifs de modèles murins de la maladie de Huntington ou chez les patients (Kim et al., 2015). Dans la SLA, la SEP et dans d'autres modèles de lésions du cortex et de la moelle, la voie est activée dans les astrocytes réactifs mais également dans la microglie, les neurones ou les macrophages (Wheeler & Quintana, 2019; Zhang et al., 2017).

De façon intéressante, l'activation de la voie NF- κ B astrocytaire est liée à des dysfonctionnements neuronaux. Par exemple, il a été montré que l'activation de la voie dans les astrocytes induit l'augmentation de la production de la molécule du complément C3 (Lian et al., 2015), un point de convergence majeur du système du complément (Zipfel & Skerka, 2009), dont son récepteur C3a est impliqué dans le développement synaptique (Stevens et al., 2007). Dans cette étude, Lian et al, montrent, *in vitro*, que C3 se fixe sur son récepteur C3a situé sur les neurones et entraîne une altération de la densité synaptique et de la morphologie des dendrites. Le blocage du récepteur C3aR restaure ces déficits (Lian et al., 2015). Dans des modèles de lésions du cortex (Jayakumar et al., 2014) et de la moelle (Brambilla et al., 2009) ainsi que des modèles d'hypoperfusion cérébrale (Saggu et al., 2016), il a été montré que l'inhibition de la voie NF- κ B dans les astrocytes réactifs améliore la survie neuronale et les fonctions cognitives.

L'ensemble de ces études montre donc l'importance de la voie dans les processus de neuroinflammation en général ainsi que dans la réactivité astrocytaire. Cependant, l'activation de cette voie n'est pas spécifique des astrocytes réactifs et est activée dans d'autres types cellulaires (Ben Haim, et al., 2015a).

Ainsi, la voie NF- κ B est impliquée dans la réactivité astrocytaire mais son rôle dans l'induction de la réactivité n'a pas été démontré. Elle semble plutôt agir comme un modulateur de cette réactivité par induction de gènes cibles potentiellement synaptotoxiques.

3.4. Autres voies de signalisation

D'autres voies de signalisation sont impliquées dans la neuroinflammation et ont été étudiées dans les astrocytes réactifs comme la voie CN/NFAT, la voie des MAPK ou encore la voie du FGF et la voie N-cadhérine.

La voie CN est ubiquitaire bien que la protéine CN soit largement exprimée dans le cerveau (**Figure 11**). Cette voie régule la transcription de gènes en modulant des facteurs de transcription comme NFAT ou NF- κ B et est impliquée la croissance, la différenciation et d'autres processus cellulaires dans les cellules T, les ostéoclastes et les myocytes (Hogan et al., 2003; Sompol & Norris, 2018). La voie est activée par des cytokines comme TNF α ou par le glutamate, qui en se fixant à leurs récepteurs membranaires spécifiques, entraînent une cascade de signalisation activant la CN qui va

déphosphoryler NFAT (**Figure 11**). NFAT activé va ensuite se lier à des séquences promotrices spécifiques pour réguler la transcription de différents gènes cibles comme *Cox2* (Furman & Norris, 2014). De manière intéressante, la CN est sensible aux niveaux de Ca^{2+} et lors de dommages neuronaux, la CN peut être clivée, engendrant son inactivation de manière irréversible (Abdul et al., 2011). En particulier, il a été montré que ce clivage protéolytique a lieu dans les astrocytes associés aux plaques amyloïdes (Pleiss et al., 2016). Cette activation de la CN par le Ca^{2+} entraîne une hyperactivation de NFAT et donc une hyperactivation de la transcription de gènes cibles (Abdul et al., 2009). La voie CN/NFAT est donc activée en conditions inflammatoires et la réactivité astrocytaire a été liée à l'activation de cette voie dans plusieurs études. Par exemple, chez les patients et modèles murins de la MA, l'immunoréactivité de CN est élevée dans les astrocytes réactifs, particulièrement autour des plaques amyloïdes (Furman & Norris, 2014). NFAT1 et 3 sont également exprimés dans les astrocytes réactifs de patients MA mais aussi dans les neurones (Abdul et al., 2009). Les effets de la voie sur la réactivité astrocytaire sont débattus et apparaissent comme contexte-dépendants. Une étude montre que la surexpression d'une forme constitutivement active de CN dans des cultures d'astrocytes d'hippocampe de rat induit des changements morphologiques de type hypertrophie associés à une surexpression de la GFAP (Norris et al., 2005). Une autre étude montre que la surexpression d'un peptide appelé VIVIT bloquant NFAT atténue la réactivité astrocytaire autour des plaques dans un modèle murin de la MA (Furman et al., 2012). Au contraire, d'autres études montrent que la surexpression de la forme constitutivement active de CN dans les astrocytes réduit la réactivité après une lésion, une injection de LPS (Fernandez et al., 2007) ou dans un modèle murin de la MA (Fernandez et al., 2012). Ainsi, la voie CN/NFAT serait donc à la fois capable d'induire et de prévenir la réactivité astrocytaire mais ces études montrent surtout que cette voie module la réactivité.

D'autres voies sont impliquées dans la neuroinflammation mais leur rôle dans la réactivité astrocytaire, notamment au cours de la MA, reste peu étudié. Par exemple, la voie des MAPK (**Figure 11**) est activée dans les astrocytes réactifs, les neurones et la microglie dans différents modèles murins de SLA (C et al., 2004; Tortarolo et al., 2003), différents modèles de tauopathies (Ferrer et al., 2001). Au contraire, dans des modèles de MA, seule une activation de p38 dans la microglie a été montrée (Koistinaho et al., 2002). D'autres études montrent que la signalisation FGF est associée à la réactivité astrocytaire (Avola et al., 2004; Fischer et al., 2004). Par exemple, dans un modèle de lésion du cortex chez le rat, le récepteur au FGF, FGFR-1 et son ligand FGF-2 sont localisés dans les astrocytes réactifs, ce qui reflète l'activation de la voie. L'étude de Kang et al montre que la signalisation FGF est requise pour maintenir les astrocytes dans leur état non réactif en conditions physiologiques (Kang et al., 2014). Enfin, la voie N-cadhérine a également été montrée comme associée à la réactivité astrocytaire. Par exemple, après une lésion de la moelle, les astrocytes réactifs activent cette voie pour former la cicatrice gliale (Hara et al., 2017).

Ainsi, la réactivité astrocytaire n'est pas un phénomène de tout ou rien avec une unique cascade de signalisation activée par un seul stimulus selon un mode ON/OFF et similaire dans toutes les situations. En effet, la réactivité est déterminée par une combinaison de signaux, provenant de différents types cellulaires et activant des voies de signalisation spécifiques. Ce réseau d'intégration des différents systèmes de signalisation

permet une régulation fine de la réactivité astrocytaire. La combinaison de différents facteurs de stimulation de la réactivité entraîne des changements en synergie, non prédictibles avec les effets individuels de chaque facteur (Hamby et al., 2012).

4. Les astrocytes réactifs, une population hétérogène

Comme montré dans notre enquête (Escartin et al., 2019), la définition des astrocytes réactifs inclue la notion d'hétérogénéité : « Les astrocytes réactifs sont hétérogènes et peuvent avoir des effets variés sur la progression de la maladie » (**Article en annexe 1**). En effet, des études récentes montrent qu'à l'image des astrocytes en conditions physiologiques, la réactivité astrocytaire est une réponse complexe et hétérogène, présentant des différences régionales, morphologiques, moléculaires et fonctionnelles (Anderson et al., 2014; Ben Haim & Rowitch, 2016; Liddelow & Barres, 2017). Dans le **Tableau 1**, nous avons résumé une sélection d'études pertinentes, réalisées majoritairement *in vivo*, qui illustrent l'hétérogénéité des astrocytes réactifs. Pour cela, nous avons classé ces différentes études selon leurs niveaux d'hétérogénéité (par exemple, morphologique) dont certaines catégories avaient déjà été proposées par Anderson et al (Anderson et al., 2014). Ce tableau révèle la complexité de la réponse astrocytaire avec différents niveaux d'hétérogénéité qui parfois, co-existent dans un même modèle. Cette synthèse révèle aussi la limitation des marqueurs utilisés pour définir la réactivité puisque la plupart de ces études caractérisent les astrocytes réactifs par une surexpression de la GFAP et des changements morphologiques évalués de manière qualitative (voir paragraphe II.3.7) (**Tableau 1**). Afin de mieux appréhender la notion d'hétérogénéité des astrocytes réactifs, certaines études princeps résumées dans le **Tableau 1** sont aussi détaillées dans les parties ci-dessous. Des études complémentaires apparues depuis la publication de ce tableau sont également détaillées.

Tableau 1 : Sélection d'études pour illustrer l'hétérogénéité des astrocytes réactifs. Ces études sont classées en fonction de différents niveaux d'hétérogénéité comme proposés par Anderson et al, 2014. Des niveaux ont été ajoutés par rapport à cette classification : espèce, sexe et état d'avancement de la maladie. La 7^{ème} colonne de la table illustre la coexistence de différents niveaux d'hétérogénéité dans une même étude. Dans les colonnes suivantes, les méthodes de quantification de l'hypertrophie des astrocytes réactifs ou de la surexpression de la GFAP sont indiquées. Si d'autres marqueurs de la réactivité ont été étudiés, ils sont indiqués dans la 10^{ème} colonne.

TABLE 3 Astrocyte reaction is a heterogeneous response

Levels of observed heterogeneity	Disease modeled	Experimental model	CNS region	Species	Examples of heterogeneity	Additional levels of heterogeneity	Hypertrophy observed? Method used	GFAP observed? Method used	Others markers of reactive astro	References
Species	Neuroinflammation	Primary astro exposed to LPS, IL1, Poly I:C		H, Ms	Only Ms astro are dependent on TLR4 or CD14, Ms & H reactive astro produce different cytokines	Signaling	n.m.	n.m.	($\nearrow$ cytokine)	Tarassishin, Suh, and Lee (2014)
Gender	PD	MPTP [M ₁], 6-OHDA [R]	Str	M, R	M: $\searrow$ Cx30 IR; R: $\nearrow$ Cx30 IR		Visual	IHC/IF		Charron et al. (2014)
	Stroke	MCAO	Cx	Ms	$\nearrow$ GFAP IR F > M		Visual	IHC/IF		Cordeau (2008)
	Trauma	SWI	Cx	Ms	Nbr Cd11 ⁺ astro around lesion M > F		Visual	IHC/IF	Vimentin	Acaz-Fonseca, Duran, Carrero, Garcia-Segura, and Arevalo (2015)
Disease	AD, epilepsy	Tg2576, KA	Cx	Ms	Loss of astro domain organization in epilepsy but not in AD	Morphological	Diolistic labeling	IHC/IF		Oberheim et al. (2008)
	Trauma, stroke, AD	SWI, MCAO, APP/PS1	Cx	Ms	Shh promotes astro proliferation & stem cell potential in open lesion only (SWI & MCAO)	Signaling	Visual	IHC/IF		Sirko et al. (2013)
	Neuroinflammation, stroke	LPS, MCAO	Cx	Ms	50% regulated genes are disease-specific	Molecular	Visual	IHC/IF	Serpina3n, Lcn2	Zamanian et al. (2012)
	Trauma, AD	SWI, APP23	Cx	Ms	Different GFAP mRNA $\nearrow$ (TBI: 82-fold, denervation: 30-fold, AD: 18-fold increase)		Visual	IHC/IF, qPCR		Burbach, Dehn, Del Turco, Staufenbiel, and Deller (2004)
Temporal	ALS	SOD1 ^{G93A}	SC	Ms	Presymptomatic stage: astro NF-KB activation delays disease progression. Symptomatic: accelerates disease progression		Visual	IHC/IF		Ouali Alami et al. (2018)
	MS	EAE	Cx, Hip, Cb, SC	Ms	Early stage: $\nearrow$ MHC-II mRNA, $\searrow$ cholesterol synthesis pathway. Late stage: $\nearrow$ MHC-II mRNA, $\searrow$ cholesterol synthesis pathway. Gene expression changes differ between the four regions	Regional, molecular	n.m.	qPCR		Itoh et al. (2018)

(Continues)



TABLE 3 (Continued)

Levels of observed heterogeneity	Disease modeled	Experimental model	CNS region	Species	Examples of heterogeneity	Additional levels of heterogeneity	Hypertrophy observed? Method used	GFAP observed? Method used	Others markers of reactive astro	References
Regional	AD	Astro cultures exposed to β APP	Cx, Hip, Cb, SC	R	Reaction induced only in Cx & hip		Visual	IHC/IF	CSPG	Hoke, Canning, Malemud, and Silver (1994)
	Epilepsy	Pilocarpine	Hip, Cx	Ms	Different transcriptional changes between Hip & Cx astro	Disease stage, molecular	Visual	IHC/IF, qPCR		Ciudadote et al. (2016)
Topographical	AD	/	Cx	H	$\nearrow$ Cx43 IR around plaques		Visual	IHC/IF, EM		Nagy, Li, Hertzberg, and Marotta (1996)
	AD	APP _{SWE} /PS1 _{DE9}	Cx	Ms	$\nearrow$ P2Y1R mediated Ca^{2+} signaling in reactive astro near plaques	Signaling	Visual	IHC/IF		Delekate et al. (2014)
	Trauma	SWI	Cx	Ms	Proliferation of juxta-vascular astro only	Functional	Visual	IHC/IF		Bardehle et al. (2013)
	SCI, trauma	Laminectomy L1/L2, Cryo-injury	SC, Cx	Ms	Scar border: elongation & proliferation ($\nearrow$ radial glia markers); Distal: No proliferation & hypertrophy ($\nearrow$ GFAP)	Morphological, functional	Morphometry	IHC/IF		Wanner et al. (2013), Kim et al. (2012)
	Trauma/excitotoxicity	SWI/KA	Ms	Ms	NFATc3 ⁺ astro are found only around lesions	Topographical	Visual	IHC/IF	NFATc3	Serrano-Pérez (2011)
Morphological	AD	3xTg-AD	Hip	Ms	Astro atrophy away from plaques ($\searrow$ GFAP surface & volume)	Topographical	Morphometry	IHC/IF		Olabarria et al. (2010)
	Trauma	Needle-induced lesion	Cx	Ms	At injury site: Mesh like morphology & small cell bodies. At the border: Enlarged soma & thick processes	Topographical, functional	Visual	IHC/IF		Martin-Lopez, Garcia-Marques, Nunez-Llaves, and Lopez-Masaraque (2013)
	TBI	Lateral fluid percussion	WM, Hip, Cx, Th	R	Intertwined processes in Hip & Cx; thick shortened processes in Th. No vimentin induction in Th	Regional, disease stage	Visual	Cajal gold sublimate stain, dot-blot	S100 β , vimentin	Hilli, Barbarese, and McIntosh (1996)

(Continues)

TABLE 3 (Continued)

Levels of observed heterogeneity	Disease modeled	Experimental model	CNS region	Species	Examples of heterogeneity	Additional levels of heterogeneity	Hypertrophy observed? Method used	GFAP observed? Method used	Others markers of reactive astro	References
Signaling	Peripheral nerve injury	Purified astro treated with EphB1 or IL6	Cx	Ms	EphB1 (but not IL6) induces protective transcriptional profile in astro via STAT3 signaling	Molecular, functional	Visual	IHC/IF, WB	EphB1/STAT3	Tyzack et al. (2017)
Stroke	MCAO		Cx	Ms	Only Notch1-STAT3-ETBR* reactive astro proliferate	Functional	Visual	IHC/IF, WB	Jagged1	LeComte, Shimada, Sherwin, and Spees (2015)
Stroke	Phototrombosis		Cx	Ms	Only Thbs4* reactive astro proliferate in SVZ via Notch1-Nfya signaling	Functional	Visual	IHC/IF	Thbs4	Benner et al. (2013)
Trauma	SWI		Cx	Ms	Only galectin 1 & 3* reactive astro proliferate	Functional	Visual	IHC/IF	Galectins	Sirko et al. (2015)
SCI	Contusion		SC	Ms	Type I collagen* astro induce scar formation via N-cadherin pathway. Not active in hypertrophic reactive astrocytes	Topographical, molecular, functional	Visual	IHC/IF, WB	Cdh2, Ctrmb1...	Hara et al. (2017)
Molecular	Neuroinfa.	Immunopanned astro LPS-treated mice	Ms		"A1" neurotoxic reactive astro induced by microglia. "A2" reactive astro express different genes, function uncharacterized	Functional	Visual	IHC/IF, qPCR	A1 & A2 panels + pan markers	Liddelew et al. (2017)
Functional	NWMI	Hypoxic-ischemic encephalopathy	Cx	H	"A2" reactive astro induce OPC maturation arrest via COX2-PGE2 signaling		Visual	IHC/IF, qPCR	COX2	Shiow et al. (2017)
Brain metastasis	Tumor resection		Cx	H	pSTAT3* astro reduce immune cell recruitment to metastases	Signaling	Visual	IHC/IF	pSTAT3	Priego et al. (2018)
MS, multifocal encephalopathy	/		WM	H	Some reactive astro uptake myelin & produce more cytokines		Visual	IHC/IF		Ponath et al. (2017)

This table presents a selection of relevant studies, performed mostly in vivo, to illustrate heterogeneity of astrocyte reactions. Different levels of observed heterogeneity can be listed as originally proposed by Anderson, Ao, and Sofroniew (2014). In addition, differences in responses are observed depending on disease stage or age (temporal), species, and gender. Interestingly, several levels of heterogeneity may co-exist (see Additional levels of heterogeneity). Most of the time, the reactive state of astrocytes was established by GFAP overexpression and morphological changes. Morphological changes were estimated qualitatively (visual), unless mentioned in the table. Some studies identified additional markers of reactive astrocytes (or subtypes). Abbreviations (by lexical field): CNS regions: Cb, cerebellum; Cx, cortex; Hip, hippocampus; SC, spinal cord; Str, striatum; Th, thalamus; WM, white matter. Diseases: AD, Alzheimer disease; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; MS, multiple sclerosis; NWM1, neonatal white matter injury; Neuroinfa., neuroinflammation; PD, Parkinson disease; SCI, spinal cord injury; TBI, traumatic brain injury. Experimental models: EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; KA, kainate; LPS, lipopolysaccharide; MCAO, middle cerebral artery occlusion; SWI, stab wound injury. Species: H, human; Mc, macaque; Mm, mammalian; Ms, mouse; R, rat. Other fields: Astro: astrocytes; CSPG: chondroitin sulfate proteoglycans; IHC/IF, immunohistochemistry or immunofluorescence; IR, immunoreactivity; n.m., not measured; WB, Western Blotting; =, unchanged; ↑, increase.

4.1. Hétérogénéité régionale et topographique

L'hétérogénéité régionale des astrocytes réactifs a déjà été exposée il y a plus de 20 ans dans l'étude de Höke et al montrant que les astrocytes de différentes régions du cerveau exposés au même stimulus toxique, comme l'A β , ne deviennent pas tous réactifs *in vitro* (Höke et al., 1994). Ce niveau d'hétérogénéité est donc en partie déterminé par des facteurs intrinsèques puisqu'il est maintenu en culture. D'autres études montrent que les astrocytes réagissent différemment en fonction de la région cérébrale dans laquelle ils se situent. Par exemple, dans un modèle murin d'épilepsie induit par la pilocarpine, des différences transcriptionnelles significatives sont observées entre les astrocytes de l'hippocampe et du cortex, à la fois en terme de gènes régulés et de leur taux d'induction, ainsi que du décours temporel (Clasadonte et al., 2016). De même, dans un modèle murin de trauma du cortex, les astrocytes de la substance blanche et grise présentent des différences d'expression protéiques importantes (Mattugini et al., 2018). Enfin, une étude récente montre que la réactivité astrocytaire en réponse à l'infection par la protéine Prion est plus forte dans les astrocytes de l'hippocampe par rapport au thalamus (Makarava et al., 2019). Ces différences inter-régionales s'expliquent en partie par des différences préexistantes entre les astrocytes des différentes régions (paragraphe I.4) en conditions physiologiques.

Les astrocytes réactifs sont également hétérogènes au niveau topographique, ce qui signifie que l'intensité de la réactivité peut être différente en fonction de la position des astrocytes par rapport à une lésion (proche ou éloigné de la lésion) (Anderson et al., 2014). Plusieurs études montrent que les astrocytes réactifs proches d'une lésion sont différents de ceux qui en sont éloignés. Par exemple, suite à une lésion du cortex, seuls les astrocytes proches de la lésion activent la voie NFAT, visible par une augmentation de l'expression de NFATc3 (Serrano-Pérez et al., 2011). Cette hétérogénéité est aussi visible dans la MA où seuls les astrocytes réactifs proches des plaques amyloïdes surexpriment le récepteur P2Y₁R impliqué dans la signalisation calcique (Delekate et al., 2014). Une étude de Bardehle et al, qui suit la réaction des astrocytes réactifs par imagerie bi-photonique après une lésion focale du cortex, montre que parmi les astrocytes qui deviennent hypertrophiques autour de la lésion, la moitié seulement polarisent leurs prolongements vers la lésion et environ 10% d'entre eux prolifèrent (astrocytes juxta-vasculaires) (Bardehle et al., 2013). Une autre étude montre que les astrocytes réactifs formant la cicatrice gliale dans un modèle de lésion de la moelle perdent leurs domaines tridimensionnels et ont un profil moléculaire différent des astrocytes réactifs situés à distance de la lésion, qui eux présentent une morphologie hypertrophique (Hara et al., 2017). Les astrocytes formant la cicatrice expriment par exemple des protéoglycans de type chondroïtine sulfate comme *Acan* et *Pcan* mais aussi la N-cadhérine alors que les astrocytes à distance expriment différents membres de la voie β -caténine (Hara et al., 2017). Une autre étude montre que les astrocytes formant la cicatrice gliale prolifèrent plus que les astrocytes hypertrophiques à distance (Wanner et al., 2013).

Ces études illustrent donc l'existence d'une hétérogénéité régionale et topographique et montrent également que différents niveaux d'hétérogénéité coexistent dans un même modèle comme le démontre l'étude d'Hara et al ou l'hétérogénéité

moléculaire et morphologiques coexistent avec l'hétérogénéité topographique (Hara et al., 2017).

4.2. Hétérogénéité morphologique

L'hétérogénéité morphologique des astrocytes réactifs a elle aussi été découverte il y a plus de 100 ans grâce à l'utilisation de la coloration de Ramon y Cajal (**Figure 9**). En particulier, l'étude de Hill et al a montré qu'après le même type de trauma, les astrocytes réactifs du cortex et de l'hippocampe possèdent des prolongements entremêlés alors que les astrocytes réactifs du thalamus ont des prolongements courts et épais (Hill et al., 1996). Aujourd'hui, des techniques comme la méthode « Star Track » permet de suivre le développement de clones astrocytaires en marquant chaque lignée de cellules avec un code spécifique d'expression de protéines fluorescentes (Bribián et al., 2016). Cette méthode a notamment permis de révéler une variété de changements morphologiques dans les astrocytes réactifs après un trauma du cortex (Martín-López et al., 2013) ou dans un modèle de SEP (Bribian et al., 2018). Par exemple, les astrocytes réactifs au centre du trauma ont une morphologie « en filet » et de petits corps cellulaires alors que les astrocytes situés sur les bords de la lésion ont des prolongements épais et de gros corps cellulaires (Martín-López et al., 2013). Ces études ont également montré que certains astrocytes réactifs dérivant du même clone présentent le même type de changements morphologiques alors que d'autres sont associés à des changements différents, suggérant à la fois un rôle des signaux intrinsèques et des signaux environnementaux dans l'établissement de l'hétérogénéité (Bribian et al., 2018; Martín-López et al., 2013). Enfin, l'hétérogénéité morphologique est également observée dans les MND comme la MA où les astrocytes à distance des plaques amyloïdes peuvent parfois être atrophiques alors que ceux en contact avec les plaques présentent une hypertrophie nette visible par une augmentation de la surface et du volume des astrocytes (Olabarria et al., 2010).

4.3. Hétérogénéité moléculaire

La réactivité astrocytaire implique des changements moléculaires complexes. Le laboratoire de Barres a grandement contribué à l'étude de l'hétérogénéité moléculaire des astrocytes réactifs. Alors que certains marqueurs sont surexprimés par la majorité des astrocytes réactifs comme *Gfap*, *Serpina3n* et *Lcn2*, l'analyse transcriptomique de Zamanian et al, a révélé que les astrocytes réactifs présentent des profils d'expression génique spécifiques en fonction du stimulus. Les auteurs ont étudiés deux conditions : une ischémie induite par occlusion de l'artère cérébrale moyenne ou une condition de neuroinflammation induite par l'injection de LPS qui active les cellules microgliales par leur récepteur TLR4 (Zamanian et al., 2012). En condition ischémique, les astrocytes surexpriment des facteurs neurotrophiques. Au contraire, en condition de neuroinflammation induite par le LPS, les astrocytes surexpriment des facteurs du complément, notamment impliqués dans l'élimination des synapses. Cette étude a conduit les auteurs à proposer que l'injection de LPS induit un type d'astrocyte réactif appelé A1 alors que l'ischémie induit un autre type d'astrocyte réactif appelé A2, en référence à la nomenclature utilisée pour les macrophages et la microglie (**Figure 14A**). Chacune de ces classes est définie par un panel de 10 à 13 gènes (exemples A1 : *H2-D1*,

H2-T23, *C3* et exemples A2 : *Cd14*, *Tm4sf1*) en plus d'un panel de 10 à 13 gènes communément exprimés entre les classes comme *Gfap*, *Vimentine* et *Serpina3n* (Liddelow et al., 2017). Par des études en culture, les auteurs ont montrés que les astrocytes réactifs de type A1 sont induits par les cytokines IL-1 α , TNF et la molécule du complément C1q (Liddelow et al., 2017) (**Figure 14A**). Ces cytokines sont majoritairement produites par la microglie et les auteurs ont montrés que l'injection de LPS chez des souris KO (Knocking out) pour le récepteur microglial *Csf1r* n'induit pas la signature moléculaire des astrocytes de type A1. Ces données suggèrent donc que la communication avec la microglie est essentielle pour l'induction de ce sous-type d'astrocyte réactif. Enfin, les auteurs ont montrés par ISH (*In situ* hybridization) que l'ARNm *C3* (marqueur A1) est exprimé dans certains astrocytes réactifs de patients atteints de MND, en particulier de la MA (Liddelow et al., 2017). Cependant, cette dichotomie des astrocytes réactifs en deux catégories extrêmes semblent restrictive et inadaptée à la complexité des réponses astrocytaires *in situ*. En effet, le cocktail de cytokines utilisé *in vitro* pour induire les astrocytes réactifs de type A1 modélise au mieux une situation pathologique aigüe et sévère et les facteurs *in vivo* sont probablement plus complexes et diversifiés (Cunningham et al., 2019). Il a d'ailleurs été montré que des marqueurs de type A1 et A2 coexistent 'en bulk' dans différents modèles comme les tauopathies (Litvinchuk et al., 2018), ou dans un modèle de souris MA (**Article 1**) (Ceyzeriat et al., 2018). Mais ces marqueurs coexistent aussi dans un même astrocyte durant le vieillissement normal (Clarke et al., 2018) ou dans l'ischémie (Liddelow et al., 2017) (**Figure 14B**). Ainsi, dans les modèles proposés en **Figure 14B**, le modèle 2 est probablement plus proche de la réalité car il ne semble pas y avoir deux uniques classes variant en terme de proportion. La question de la définition d'un astrocyte de type A1 et des marqueurs utilisés pour le définir est davantage discuté dans la revue en **Annexe 1**.

Le développement récent de techniques de séquençage sur cellules uniques a permis de mieux caractériser cette hétérogénéité moléculaire, sans a priori. Les études de RNAseq sur noyaux uniques ont notamment permis d'identifier de nouvelles sous populations moléculaires d'astrocytes réactifs dans la maladie de Huntington (Al-Dalahmah et al., 2020), la MA (Habib et al., 2020; Mathys et al., 2019) et la SEP (Wheeler et al., 2020). Certaines de ces études ont identifié des populations d'astrocytes spécifiques de maladie comme dans un modèle murin de la MA où Habib et al montrent une sous population d'astrocytes apparaissant à des stades précoces de la maladie dans l'hippocampe. Les auteurs nomment cette population DAA pour « disease-associated astrocytes ». Ils montrent que les DAA sont associés à une signature transcriptomique spécifique dont certains gènes sont exprimés aussi par les DAM « disease-associated microglia » (voir paragraphe III.1.2). Les auteurs confirment la présence de cette population autour des plaques amyloïdes et de manière intéressante, son abondance relative augmente avec la progression de la maladie (Habib et al., 2020). L'étude de Wheeler et al dans un modèle de SEP a identifié une population d'astrocytes réactifs spécifiques caractérisés par une augmentation de *MAFG* codant le facteur de transcription MafG et une diminution de l'expression de *Nfe2l2* codant le facteur de transcription Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2)). MafG est impliqué dans la méthylation de l'ADN, provoquant le blocage de programmes transcriptionnels anti-inflammatoires et Nrf2 est impliqué dans le contrôle du stress oxydatif et de l'inflammation. Ainsi, la sous population identifiée pourrait contribuer à la SEP en favorisant l'inflammation (Wheeler et al., 2020).

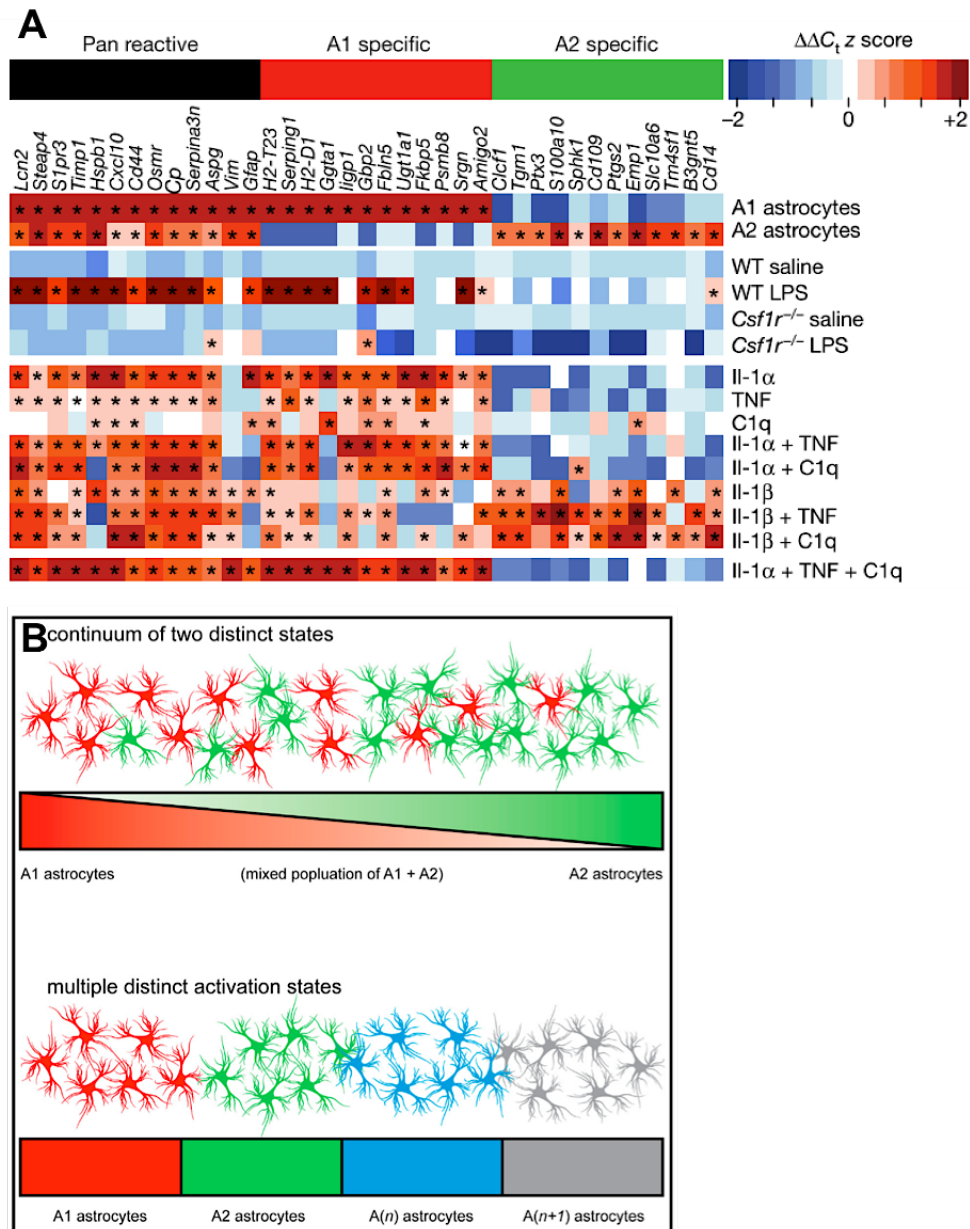


Figure 14. Signature transcriptomique des astrocytes réactifs de type A1 et A2 dans l'étude de Liddelow et al, 2017. A. Représentation en « heatmap » des transcrits des astrocytes des différentes sous-populations. Les marqueurs pan réactifs correspondent à ceux exprimés dans les 2 types d'astrocytes réactifs. Différentes conditions de culture ont ensuite été testées pour déterminer dans lesquelles apparaissent les astrocytes de type A1. *In vivo*, l'injection de LPS induit le type A1 (4^{ème} ligne)(Zamanian et al, 2012). Les souris *Csf1r*^{-/-} (absence de microglie) ne produisent pas d'astrocytes A1 même en cas d'injection de LPS (6^{ème} ligne). Différentes cytokines ont ensuite été placées dans le milieu de culture. L'ensemble des marqueurs de type A1 sont exprimés après exposition à l'IL-1 α , du TNF et C1q, suggérant que les microglies sont responsables de l'activation des astrocytes réactifs A1 via ce cocktail de cytokines. (Liddelow et al, 2017). B. Modèle proposé par Liddelow et al pour la délimitation potentielle des profils d'astrocytes réactifs. Modèle 1 : S'il existe uniquement ces deux classes d'astrocytes réactifs, elle pourrait exister en continuum avec une population mixte A1/A2. Modèle 2 : Il pourrait y avoir d'autres classes d'astrocytes réactifs distinctes des classes de type A1 et A2. Extrait de Liddelow et al, 2017.

4.4. Hétérogénéité de signalisation

L'hétérogénéité moléculaire décrite dans les études précédentes pourrait être due à une hétérogénéité des cascades de signalisation qui contrôlent la réactivité. Dans l'étude d'Hara et al, précédemment mentionnée, les auteurs montrent que le gène *Col1* codant pour le collagène I, une protéine de la matrice extracellulaire, est surexprimé dans l'environnement de la moelle lésée. De manière intéressante, *in vitro*, ils montrent que le collagène I induit la voie N-cadhérine dans les astrocytes proches de la lésion et cette interaction conditionne leur transformation d'astrocytes réactifs en astrocytes prolifératifs qui forment la cicatrice gliale. *In vivo*, le blocage de l'interaction du collagène I par un anticorps, empêche la formation de la cicatrice gliale et améliore la récupération fonctionnelle. Au contraire, les astrocytes situés à distance de la lésion sont associés à la signalisation β -caténine (Hara et al., 2017). D'autres voies de signalisation ont été impliquées dans la prolifération des astrocytes au niveau de la cicatrice gliale. Par exemple, dans un modèle de trauma du cortex, seuls les astrocytes prolifératifs expriment les gènes *Lgals1* et *Lgals3* codant pour les galectines 1 et 3, des protéines de liaison aux sucres β -galactosides (Sirko et al., 2015). Dans un modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne, les astrocytes prolifératifs expriment la voie Jagged1/Notch1 (LeComte et al., 2015). Enfin, dans un modèle de SLA, une étude montre une surexpression du récepteur EphB1 (Ephrine type-B receptor 1) uniquement dans les motoneurones lésés (Tyzack et al., 2017). *In vitro*, les auteurs montrent que ce récepteur induit une réactivité astrocytaire associée à un profil transcriptionnel protecteur via la signalisation STAT3 dans les astrocytes réactifs. De manière intéressante, cette étude montre que la signalisation EphB1-STAT3 est perturbée dans des modèles murins de SLA ou des cellules souches pluripotentes induites de patients. Au contraire, des expériences de culture avec l'IL-6, un activateur canonique de la voie STAT3, induit une réactivité astrocytaire qui n'est pas associée à une signature moléculaire protectrice (Tyzack et al., 2017). Cette étude suggère donc que différents signaux activant une même cascade de signalisation peuvent avoir des effets différents.

4.5. Hétérogénéité fonctionnelle

L'ensemble des études précédentes montre donc la diversité des changements morphologiques et moléculaires dans les astrocytes réactifs. Certaines de ces études mènent d'ailleurs à la classification des astrocytes réactifs en différentes classes (Liddel et al., 2017). Dans cette étude, les auteurs montrent que les astrocytes de type A1 surexpriment des molécules du complément, suggérant un rôle délétère sur les synapses (Liddel et al., 2017). Ils vérifient cette hypothèse dans des expériences de culture de cellules ganglionnaires de la rétine avec des astrocytes de type A1. Ils montrent une diminution du nombre de synapses formées et de leur fonctionnalité en présence d'astrocytes A1 comparé à des astrocytes contrôles. Ils montrent également que les astrocytes A1 perdent leur capacité de phagocytose des synaptosomes ou de débris de myéline. Enfin, les auteurs montrent que les astrocytes A1 sécrètent une toxine soluble agissant sur certains types de neurones et les oligodendrocytes matures, entraînant leur mort en culture. Aucune caractérisation fonctionnelle des astrocytes de type A2 n'est réalisée dans cette étude, les auteurs suggèrent seulement des fonctions neuroprotectrices

de cette classe, basée sur son profil d'expression de gènes (Liddelow et al., 2017; Zamanian et al., 2012).

Une des fonctions majoritairement étudiée dans l'hétérogénéité des astrocytes réactifs est la capacité de prolifération de certains sous types associés à la cicatrice gliale dans des modèles de lésion du cortex et de la moelle. En effet, contrairement aux travaux initiaux sur la réactivité où il avait été suggéré que la prolifération était une caractéristique commune aux astrocytes réactifs (Chaslin, 1891 ; Ramon y Cajal, 1925), plusieurs études ont aujourd'hui montré que seuls quelques astrocytes formant la cicatrice gliale sont dotés de cette capacité de prolifération en réalisant seulement un ou deux cycles de division. En particulier, l'étude de Bardehle et al, précédemment présentée, montre que parmi les astrocytes hypertrophiques au niveau de la lésion du cortex, seuls 16% prolifèrent (Bardehle et al., 2013). Cette étude montre donc que les capacités de prolifération et de migration des astrocytes sont limitées. Les astrocytes prolifératifs correspondent à un sous type dont le corps cellulaire est en contact avec les vaisseaux sanguins, suggérant que la capacité de prolifération est dépendante d'un stimulus sanguin. En effet, une autre étude montre que les astrocytes qui forment les bords de la cicatrice gliale après une lésion de la moelle, sont dotés d'une capacité de prolifération et régulent l'infiltration des cellules immunitaires (Wanner et al., 2013). Récemment, une étude a démontré un lien entre l'invasion des monocytes et la capacité de prolifération des astrocytes (Frik et al., 2018). Dans cette étude, les auteurs étudient un modèle de souris transgéniques dont le récepteur CCR2, nécessaire à l'invasion du cerveau par les monocytes, est délété. Ils montrent que cette délétion provoque une augmentation de la prolifération des astrocytes réactifs, démontrant une régulation négative entre ces cellules à l'interface vasculaire (Frik et al., 2018).

Au contraire, cette capacité de prolifération est limitée voire absente dans des conditions pathologiques chroniques comme les MND (Cunningham et al., 2019; Perez-Nievas & Serrano-Pozo, 2018). Par exemple, des études ne montrent que 5% d'astrocytes prolifératifs dans un modèle MA (Sirko et al., 2013) et 20% dans un modèle de SLA dont l'ablation n'a pas d'impact sur la maladie (Lepore et al., 2008). Ainsi, les premières études montrant une prolifération importante des astrocytes témoignent probablement d'une mauvaise interprétation de l'augmentation du nombre d'astrocytes visibles GFAP⁺. On sait en effet que les niveaux d'expression de la GFAP sont faibles voire nuls en conditions physiologiques dans certaines régions (voir discussion dans le paragraphe II.4.7). La réactivité astrocytaire provoque alors une augmentation de l'expression de la GFAP qui n'était pas forcément visible en condition normale (Dimou & Götz, 2014).

Enfin, des études démontrent l'implication de certains types d'astrocytes réactifs dans d'autres fonctions. Par exemple, Ponath et al, ont identifiés une sous-population d'astrocytes réactifs capables de phagocyter la myéline après démyélinisation dans la SEP chez l'Homme (Ponath et al., 2017). L'étude de tumeurs chez l'Homme a montré l'existence d'un sous type d'astrocytes réactifs phosphorylés sur STAT3 et capables de réduire le recrutement des cellules immunitaires au niveau de la tumeur (Priego et al., 2018). Dans un cas d'encéphalopathie néonatale, il a été montré que les astrocytes réactifs avec une signature transcriptionnelle de type A2 induisent un arrêt de la maturation des OPC (oligodendrocytes progenitor cells) via la signalisation Cox2-PGE2 (PGE : prostaglandine E) (Shiow et al., 2017). Dans la MA, l'étude du Ca²⁺ astrocytaire en microscopie multi-photonique a montré que les astrocytes réactifs proches des plaques

amyloïdes ont des signaux calciques hyperactifs. Ces dysfonctions sont liées à la signalisation purinergique puisque le blocage des récepteurs P2Y1 restaure l'activité calcique des astrocytes (Delekate et al., 2014; Reichenbach et al., 2018).

4.6. Hétérogénéité dans les maladies et leurs décours temporels

Un autre niveau d'hétérogénéité peut être considéré en fonction du contexte pathologique. Il a en effet été montré que le type de stimulus et donc le contexte pathologique influence le profil d'expression des gènes comme dans l'étude de Zamanian où 50% des gènes régulés sont spécifiques à l'injection de LPS ou à l'ischémie (Zamanian et al., 2012). Une autre étude compare les signaux entraînant la prolifération des astrocytes entre une condition pathologique avec lésion ouverte comme le trauma de la moelle ou l'ischémie par occlusion de l'artère cérébrale moyenne et une condition avec lésion non invasive comme l'amyloïdose chez les souris modèles de la MA. Cette étude montre que la signalisation SHH régule la prolifération des astrocytes seulement dans les lésions ouvertes (Sirko et al., 2013). L'étude d'Oberheim et al, compare l'organisation des domaines astrocytaires entre un modèle d'épilepsie et un modèle de la MA et montre que la perte de cette organisation a seulement lieu dans une condition d'épilepsie (Oberheim et al., 2008).

Les astrocytes réactifs répondent aussi différemment en fonction du stade de la maladie. Par exemple, dans un modèle de SLA, l'activation de la voie NF- κ B dans les astrocytes réactifs retarde la progression de la maladie dans des stades pré symptomatiques alors qu'au contraire, elle accélère la progression de la maladie au stade symptomatique (Ouali Alami et al., 2018). Dans un modèle de SEP, des différences moléculaires sont observées entre les stades précoces et tardifs de la maladie (Itoh et al., 2018). A des stades précoces, les astrocytes réactifs surexpriment l'ARNm *H2-Ab* codant pour le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II et la voie de synthèse du cholestérol n'est pas modifiée. Au contraire, à des stades tardifs, la surexpression de *H2-Ab* est plus modérée et la voie de synthèse du cholestérol est régulée négativement (Itoh et al., 2018).

Finalement, les travaux récents montrent que la réactivité astrocytaire est non stéréotypique et extrêmement sensible au contexte pathologique. Ceci se traduit par une hétérogénéité à différents niveaux, allant du plus intégré avec des différences de réactivité entre espèces ou en fonction du sexe (détaillé dans la **Table 1**) à des niveaux plus raffinés avec des différences de profil moléculaire entre astrocytes réactifs au sein d'un même modèle et d'une même région cérébrale. La réactivité astrocytaire est ainsi définie par des changements communs comme la surexpression de la GFAP ou des modifications morphologiques mais aussi par des changements spécifiques du contexte, probablement eux même dépendants de l'hétérogénéité basale (**Figure 15**).

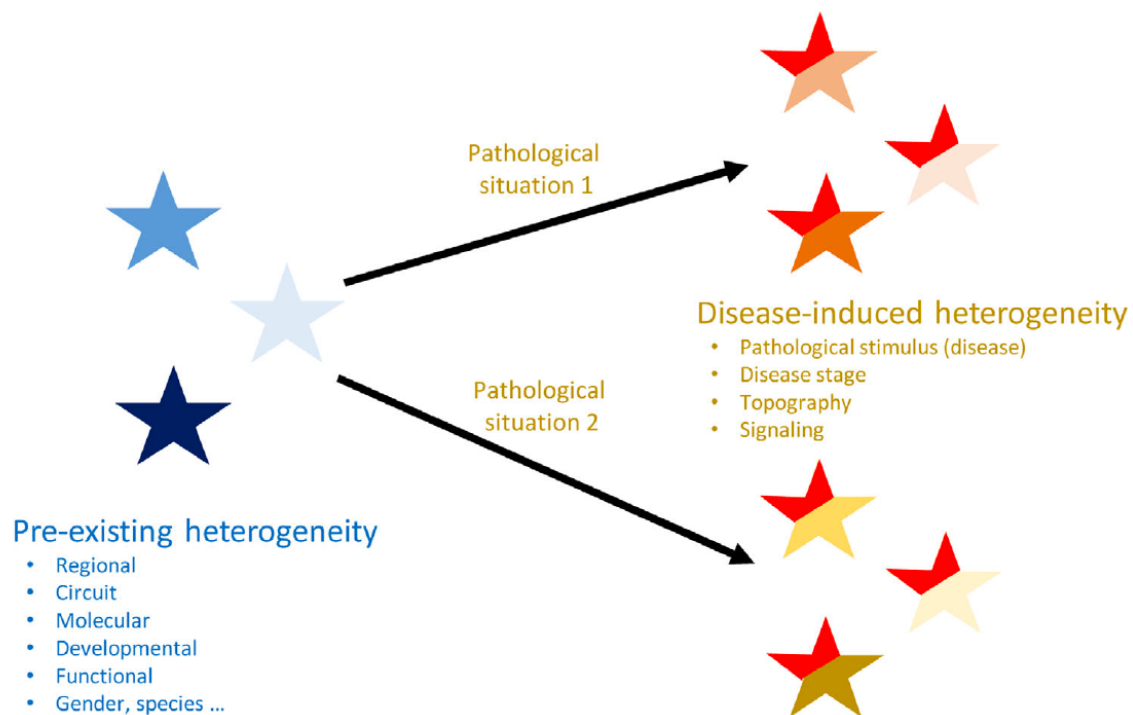


Figure 15. Hétérogénéité des astrocytes réactifs : causes et manifestations. En conditions physiologiques, les astrocytes présentent différents niveaux d'hétérogénéité. En conditions pathologiques, les astrocytes deviennent réactifs et cette réactivité n'est pas stéréotypée et dépend par exemple du stimulus pathologique. Cette hétérogénéité se manifeste à différents niveaux également et entraîne des changements à la fois communs (représentés en rouge) et spécifique à chaque sous-population (autres couleurs). Extrait de Escartin et al, 2019.

4.7. Limitations des approches d'exploration de l'hétérogénéité des astrocytes réactifs et perspectives

Ainsi, l'ensemble des études présentées montre bien une hétérogénéité de la réactivité astrocytaire observée à différents niveaux en conditions pathologiques (**Table 1**). Toutes ces études caractérisent les astrocytes réactifs par une surexpression de l'expression de la *Gfap* et des changements morphologiques évalués de manière souvent qualitative (**Table 1**). Comme discuté dans la partie II.2.2, la *Gfap* est induite dans toutes les études transcriptomiques, ce qui confirme son utilisation en tant que marqueur de la réactivité (Liddelow et al., 2017; Orre et al., 2014a; Zamanian et al., 2012). Cependant, quelques limitations sont à prendre en compte : 1) en condition physiologique, l'expression de la GFAP n'est pas uniforme dans les astrocytes, en particulier dans les modèles murins chez qui elle est préférentiellement exprimée par les astrocytes de la substance blanche (Bushong et al., 2002). Dans la substance grise, les astrocytes de l'hippocampe expriment davantage la GFAP par rapport à d'autres structures comme le thalamus et le striatum, qui ne l'expriment que très peu (Khakh & Sofroniew, 2015; Sofroniew & Vinters, 2010). A cause de cette variabilité d'expression basale, il est donc difficile d'interpréter des différences de réactivité entre les régions du cerveau, sur la base de l'expression de la GFAP seulement. 2) L'immunohistochimie GFAP ne marque que 15% du volume total occupé par les astrocytes, ce qui permet de rendre compte en partie seulement, de la

morphologie complexe de ces cellules (Wilhelmsson et al., 2006). En particulier, la GFAP reflète globalement l'hypertrophie des astrocytes en conditions pathologiques mais des changements morphologiques plus subtils peuvent avoir lieu, notamment au niveau des prolongements les plus fins. Des techniques alternatives comme le remplissage du cytosol par des sondes fluorescentes en patch clamp, l'expression de protéines fluorescentes dans le cytosol par des approches virales ou dans des souris transgéniques ou encore la visualisation des prolongements en microscopie électronique, permettent de mieux évaluer les changements morphologiques. 3) Enfin, le niveau d'induction de la GFAP en conditions pathologiques peut lui aussi varier (Pekny et al., 2019).

Pour pallier à ces limitations, l'identification de nouveaux marqueurs pourrait permettre de mieux caractériser la réactivité astrocytaire. L'étude du profil transcriptionnel des astrocytes réactifs à l'échelle du génome entier pourrait être une solution pour définir des marqueurs pan réactifs ou des marqueurs spécifiques de sous populations comme il a déjà été démontré dans plusieurs études (Hara et al., 2017; Liddel et al., 2017). De même l'extension de l'étude transcriptomique de Zamanian et al, à d'autres modèles de maladie pourrait permettre d'identifier des marqueurs d'astrocytes réactifs spécifiques de chaque maladie. Plusieurs études ont montrés l'intérêt du RNAseq sur cellules uniques ou noyaux uniques pour étudier l'hétérogénéité des astrocytes réactifs (Habib et al., 2020; Mathys et al., 2019; Wheeler & Quintana, 2019b). Cependant, la finalité est de déterminer les fonctions spécifiques des différentes classes d'astrocytes identifiées et notre synthèse (Table 1) montre bien que très peu d'études fonctionnelles sont aujourd'hui réalisées. Certaines fonctions comme la capacité de phagocytose et l'effet sur les synapses (Liddel et al., 2017) peuvent être étudiées facilement *in vitro* mais il est plus compliqué d'explorer les fonctions des sous populations d'astrocytes réactifs *in vivo*. Des méthodes de résolution cellulaire comme l'électrophysiologie, la cytométrie et l'imagerie bi-photonique ont néanmoins permis de mieux explorer la complexité des fonctions des astrocytes réactifs (Bardehle et al., 2013; Delekate et al., 2014; John Lin et al., 2017). Ces méthodes ont toutes été combinées avec des marqueurs morphologiques ou moléculaires pour s'assurer de l'étude spécifique des astrocytes réactifs. De plus, il est aujourd'hui difficile de distinguer les contributions des astrocytes par rapport à celles de la microglie, activée conjointement et largement impliquée dans la neuroinflammation. Il n'existe à nouveau que des méthodes *in vitro*, comme l'immunopanning, permettant de cultiver les cellules séparément pour comprendre leur contribution mais ces études présentent aussi des limitations (Foo et al., 2011; Liddel et al., 2017; Liddel & Barres, 2017).

Enfin, des études morphologiques et transcriptomiques d'astrocytes entre la souris et l'Homme ont révélées d'importantes différences (Oberheim et al., 2009; Tarassishin et al., 2014), impliquant que les observations réalisées chez la souris doivent être validées chez l'Homme (Arranz & De Strooper, 2019). L'utilisation de cellules souches pluripotentes induites de patients dérivées en astrocytes pourrait permettre de mieux comprendre les changements des astrocytes réactifs en conditions pathologiques (Tyzack et al., 2016).

La réactivité astrocytaire apparaît donc comme un phénomène complexe, dépendant du contexte et impliquant de multiples changements dans les astrocytes, y compris en terme fonctionnel. La compréhension de ces changements est primordiale pour évaluer l'impact des astrocytes réactifs sur les neurones environnants. Pour cela, il est

crucial de déterminer les inducteurs de la réactivité et les cascades de signalisation qui modulent la réactivité.

III. Les astrocytes réactifs dans la maladie d'Alzheimer

1. La maladie d'Alzheimer

La MA est la cause de démence la plus fréquente. Elle affecte environ 47 millions de personnes à travers le monde selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Ce nombre représente 5 à 8% de la population âgée de plus de 60 ans. Avec 10 millions de nouveaux cas par an et un coût sociétal de plus de 600 milliards de dollars, la MA représente un enjeu prioritaire de santé publique (OMS, rapport de 2019).

Bien que caractérisée pour la première fois en 1906 par Aloïs Alzheimer sur sa patiente Auguste D., les mécanismes sous-jacents de la maladie restent mal compris (Alzheimer et al., 1995).

Néanmoins, de nombreux facteurs de risques ont été identifiés comme des facteurs génétiques (ApoE ϵ 4, TREM2 Triggered receptor expressed on myeloid cell 2, etc), des facteurs environnementaux (alimentation riche, peu d'activité physique, etc), des facteurs de comorbidité (maladies cardiovasculaires, diabète, dépression, etc) ou encore le sexe avec une incidence plus importante chez les femmes. Cependant, le principal facteur de risque reste l'âge (Armstrong, 2019; Hou et al., 2019).

La majorité des cas de MA (>95%) apparaît sous forme sporadique, liée à des facteurs environnementaux ou à l'âge, tandis que les formes familiales de la maladie (<5%) sont causées par des mutations dans des gènes responsables de la production de peptides A β comme la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) ou les sous unités Préséniline 1 et 2 (PS1 et PS2) de la γ -sécrétase (Querfurth & LaFerla, 2010).

1.1. Caractérisation clinique et physiopathologique

Symptômes cliniques

La MA est principalement caractérisée par des troubles progressifs de la mémoire et des dysfonctionnements exécutifs, altérant la vie quotidienne du patient. Ces pertes de mémoire s'accompagnent généralement d'autres symptômes cognitifs comme des troubles du langage (aphasie), des problèmes moteurs (apraxie), une incapacité à reconnaître des objets ou des visages familiers (agnosie) ainsi que des problèmes d'orientation et une confusion dans l'espace et dans le temps. Enfin, ces symptômes sont accompagnés d'une détérioration globale du comportement social et de la motivation, conduisant à une perte d'autonomie du patient (Atri, 2019; Scheltens et al., 2016).

Il est intéressant de noter que le tableau clinique de la MA est très hétérogène, particulièrement chez les individus de moins de 65 ans. Sur la base de cette hétérogénéité clinique, 8 stades de la maladie ont été proposés dont le stade prodromal, MCI (Mild cognitive impairment) et le stade typique de la MA, entre autres (Albert et al., 2011). Au stade prodromal, les patients présentent uniquement des pertes de la mémoire épisodique sans altérations majeures de la vie quotidienne. Même au stade MCI, les symptômes sont hétérogènes puisque certains patients présentent des troubles de la mémoire intensifiés par rapport au stade prodromal mais qui n'ont toujours pas d'impact majeur sur la vie quotidienne du patient alors que d'autres présentent déjà des dysfonctionnements

exécutifs de l'attention, de la résolution de problèmes ou de la réalisation de tâches simultanées (Atri, 2019).

Pathologie à l'échelle cellulaire

La physiopathologie de la maladie est liée à la mort des neurones, s'initiant dans le cortex entorhinal, l'amygdale et l'hippocampe. Ces régions sont particulièrement vulnérables et présentent une forte atrophie visible sur des cerveaux post-mortem (**Figure 16A**) (Pini et al., 2016). L'atrophie de l'hippocampe semble particulièrement corrélée aux déficits mnésiques observés chez les patients (Scheltens et al., 2016). Plus tardivement dans la maladie, l'atrophie s'étend aux autres régions subcorticales (Pini et al., 2016).

Au niveau cellulaire, l'accumulation de protéines A β mal repliées, l'hyperphosphorylation de la protéine Tau et l'activation des cellules gliales sont les principales caractéristiques de la MA.

Les plaques amyloïdes (**Figure 16B**) sont composées de dépôts extracellulaires d'A β , en particulier les peptides A β de 39 à 43 acides aminés, produits anormaux de la protéolyse de la protéine APP (Querfurth & LaFerla, 2010). L'APP est normalement clivée par l' α -sécrétase et la γ -sécrétase (voie non amyloïdogénique). En revanche, si le premier clivage de l'APP est réalisé par la β -sécrétase, cela mène à la production de peptides A β solubles (voie amyloïdogénique, **Figure 17**). Ces peptides solubles subissent d'importants changements de leur conformation 3D en feuillets β , entraînant leur agrégation pour former des fibrilles et des plaques (**Figure 17**). Ces plaques apparaissent

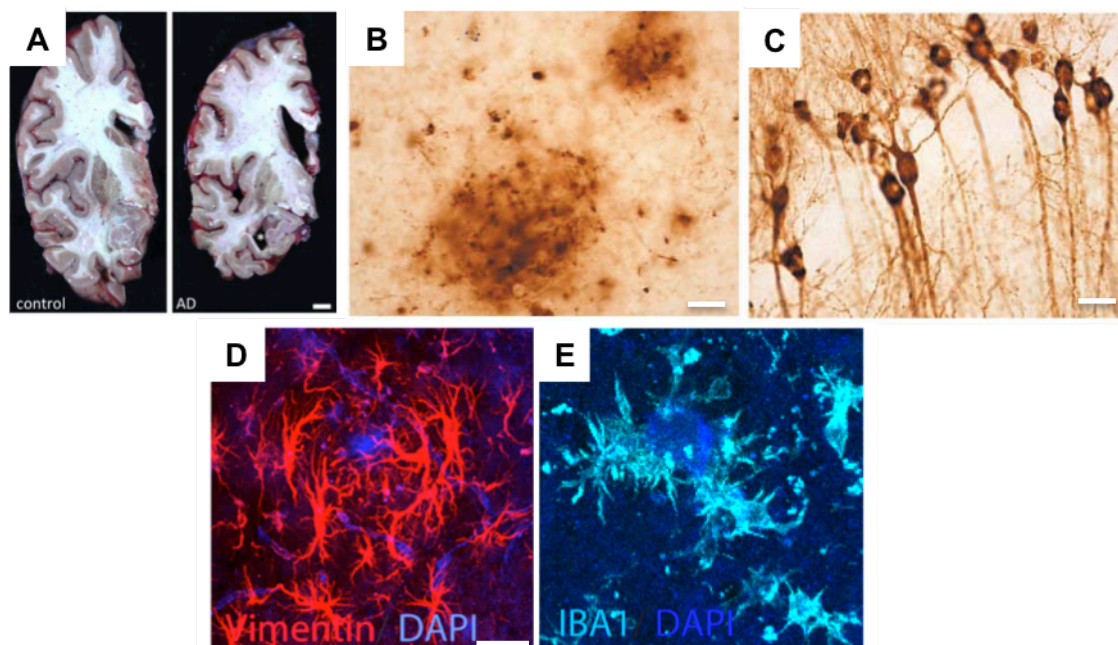


Figure 16. Caractéristiques histologiques de la maladie d'Alzheimer. A. Cerveau d'un patient MA (droite) présentant une atrophie cérébrale par rapport à un sujet sain (gauche) (Spire-Jones et al, 2014). B. Plaques amyloïdes marquées avec un anticorps anti A β 42 (marron) sur une coupe de souris modèle de la MA (Oddo et al, 2003). C. Dégénérescences neurofibrillaires intra-neurales marquées par un anticorps anti HT7 sur une coupe de souris modèle de la MA (Oddo et al, 2003). D. Activation des cellules gliales. Astrocytes réactifs marqués par la vimentine (rouge) autour d'une plaque amyloïde (bleu) (Heneka et al, 2015). E. Neuroinflammation. Microglies activées marquées par Iba1 (cyan) autour d'une plaque amyloïde (bleu) (Heneka et al, 2015).

tôt dans la maladie au niveau du néocortex pour s'étendre lentement aux autres régions du cerveau (Spire-Jones & Hyman, 2014). Les plaques amyloïdes sont aussi capables de s'associer aux neurites dystrophiques, on parle de plaques neuritiques ou encore aux vaisseaux sanguins cérébraux ce qui contribue à l'angiopathie amyloïde cérébrale (paragraphe III.1.2).

L'implication relative de l'A β soluble par rapport à l'A β agrégé sous forme de plaques reste mal compris dans la MA mais un grand nombre d'études montrent que les formes oligomériques solubles de l'A β semblent être plus toxiques que les formes agrégées (Sengupta et al., 2016).

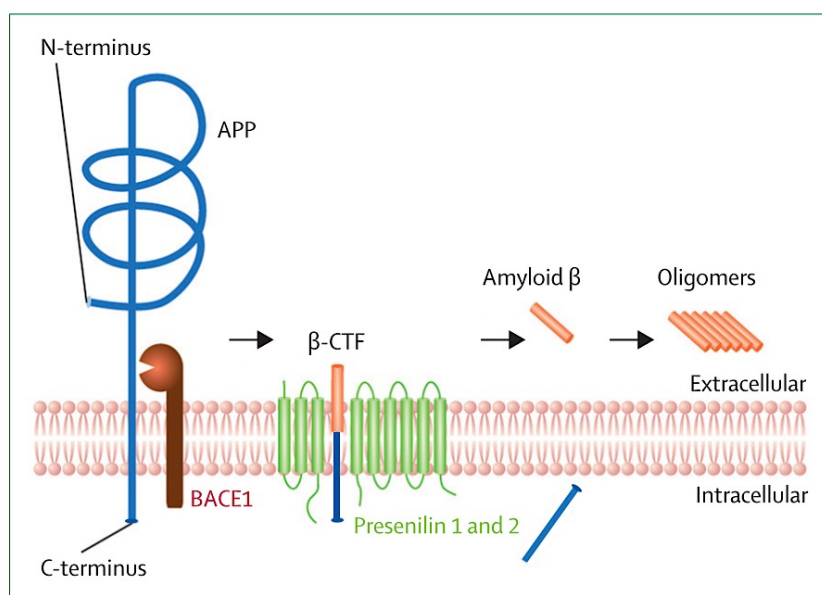


Figure 17. Métabolisme de l'APP par la voie amyloïdogénique. L'action de la β -sécrétase (BACE1) à la place de l' α -sécrétase entraîne la production des monomères A β solubles qui s'agrègent pour former des fibrilles et des plaques. Extrait de Heneka et al, 2015.

La présence de dégénérescences neurofibrillaires intra-neuronales (**Figure 16C**), composées de formes hyperphosphorylées de la protéine Tau, est une autre caractéristique essentielle de la MA. La protéine Tau est une protéine associée aux microtubules, exprimée dans les neurones où elle participe au maintien et à la stabilité de leur cytosquelette ainsi qu'au transport vésiculaire. Il existe 6 isoformes de cette protéine, obtenus par épissage alternatif de l'ARNm du gène *MAPT* (Microtubule-associated protein Tau) (chromosome 17), et qui se distinguent par les exons présents dans le domaine N-terminal et les séquences répétées au niveau du domaine de liaison aux microtubules. Ces séquences peuvent être répétées 3 ou 4 fois, on parle de formes 3R et 4R, respectivement (Luna-Munoz et al., 2013; Yipeng Wang & Mandelkow, 2016) (**Figure 18A**). En conditions physiologiques, les isoformes de Tau sont en équilibre mais cet équilibre est perturbé dans la MA. De plus, la protéine Tau peut être anormalement hyperphosphorylée sur de nombreux sites physiologiques ou directement phosphorylée sur des sites pathologiques (**Figure 18B**). Ces hyperphosphorylations entraînent des changements conformationnels de la protéine normalement soluble vers une conformation en feuillets β qui induit son agrégation dans les neurones sous forme de

filaments hélicoïdaux appariés et ensuite d'enchevêtrements neurofibrillaires (NFT, neurofibrillary tangles) (Querfurth & LaFerla, 2010) (**Figure 18C**). Sous forme hyperphosphorylée, la protéine Tau perd aussi son affinité pour les microtubules, ce qui induit une désintégration des microtubules et une perturbation du transport axonal. Plus récemment, il a aussi été montré que la protéine Tau altère aussi le transport nucléocytoplasmique dans la MA (Eftekharzadeh et al., 2018).

L'agrégation de Tau démarre dans le cortex entorhinal, s'étend dans l'hippocampe et les cortex associatifs avant de s'étendre à toutes les régions du cerveau (Querfurth & LaFerla, 2010; Spires-Jones & Hyman, 2014).

Tout comme l'A β , des études récentes suggèrent que les formes oligomériques de Tau sont plus toxiques que les NFT mais les mécanismes d'implication de ces oligomères dans la neurodégénérescence restent incompris (Shafiei et al., 2017).

Enfin, en plus de la présence d'A β et de Tau, une activation importante des cellules gliales est observée dans le cerveau des patients, notamment autour des plaques amyloïdes. Il s'agit d'un processus complexe au cours duquel les astrocytes et les microglies deviennent réactifs (**Figure 16D, E**) (Masgrau et al., 2017; Yang & Zhou, 2019). D'autres types cellulaires sont également associés à ces processus comme les cellules immunitaires périphériques et les neurones libérant des signaux activateurs.

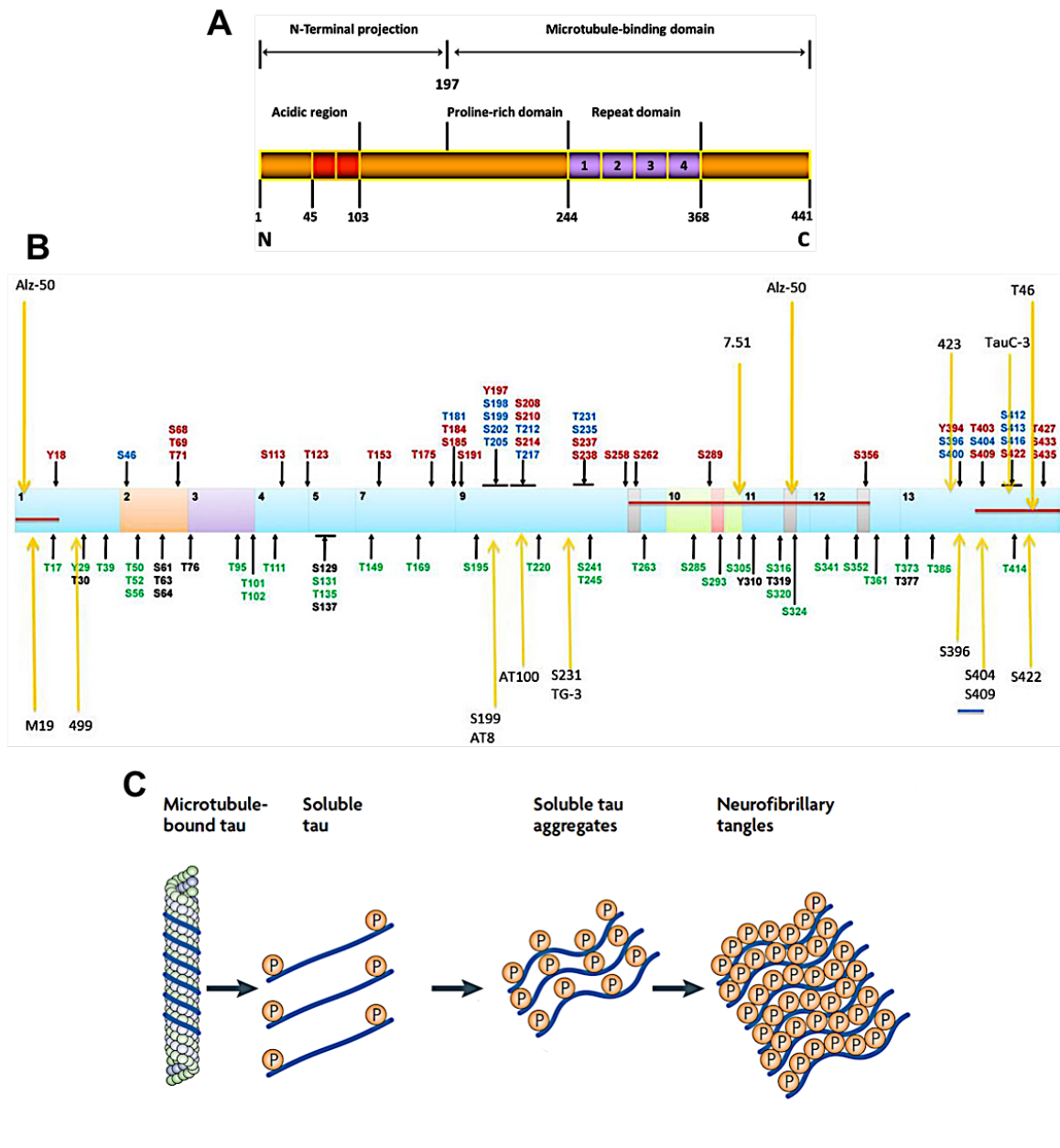


Figure 18. Formation de dégénérescences neurofibrillaires et agrégation de la protéine Tau suite à son hyperphosphorylation. A. Représentation schématique des domaines fonctionnels de la protéine Tau. La partie violette correspond aux domaines répétés formant les différents isoformes (ici, isoforme 4R). (Luna-Munoz et al, 2013). B. Principaux sites de phosphorylation et sites de reconnaissance des principaux anticorps. Certaines phosphorylations sont physiologiques (vert), pathologiques (rouge) ou retrouvées à la fois dans des certains sujets sains et patients atteints de la MA (bleu). (Luna-Munoz et al, 2014). C. L'hyperphosphorylation de la protéine Tau entraîne sa solubilisation et son agrégation sous formes d'oligomères et de NFTs. (Lee et al, 2010).

1.2. Diagnostic, biomarqueurs et imagerie

La première étape du diagnostic de la MA se base sur des tests standards des fonctions mentales, appelés MMSE (Mini mental state examination), pour détecter les signes d'altérations cognitives comme les pertes de mémoire. Par exemple, le test FCSRT (Free and cued selective reminding test) permet d'évaluer la présence et la nature des difficultés de mémoire épisodique verbale (Buschke, 1984). Cependant, ces types de tests ne sont pas sensibles aux changements cognitifs précoces et ce sont justement les déficits de mémoire qui poussent les patients à consulter, entraînant un diagnostic tardif. Avec le développement de nouveaux marqueurs, le diagnostic de la MA combine aujourd'hui les tests mentaux avec l'imagerie et les biomarqueurs.

Le principal biomarqueur de la MA est l'atrophie des différentes régions, et en particulier celle de l'hippocampe (**Figure 19A**). Ce critère peut être suivi de façon longitudinale par IRM (Imagerie par résonance magnétique) pour déterminer la progression de la maladie (Mantzavinos & Alexiou, 2017; Weller & Budson, 2018). Cependant, cette atrophie n'est pas spécifique de la MA.

L'imagerie amyloïde par TEP (Tomographie par émission de positons) avec des ligands fluorés permet de visualiser la présence des plaques amyloïdes (**Figure 19B**) (Mantzavinos & Alexiou, 2017; Weller & Budson, 2018). En particulier, le traceur PIB (^{11}C -labelled Pittsburgh compound B) est largement utilisé pour le diagnostic car il corrèle avec les plaques amyloïdes observées en post-mortem (Ikonomovic et al., 2012) (**Figure 19C**).

Certains traceurs de Tau sont actuellement testés chez l'Homme pour détecter l'agrégation de la protéine mais de plus amples études sont nécessaires pour une utilisation à des fins de diagnostic (Saint-Aubert et al., 2017). Enfin, l'hypométabolisme cérébral détecté par imagerie TEP au [18F]-FDG (Fluorodeoxyglucose) est aussi une caractéristique de la MA lorsqu'il se situe dans le néocortex temporo-pariétal (Ou et al., 2019) (**Figure 19B**).

Enfin, un autre champ des biomarqueurs implique la mesure de la concentration en peptides A β et en protéines Tau totales et hyperphosphorylées dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Globalement, ces études montrent que les mesures de Tau totales/hyperphosphorylées et d'A β 42 sont assez précises et capables de discriminer différents stades comme le MCI (Olsson et al., 2016). Ces méthodes présentent l'avantage d'être moins coûteuses que l'imagerie TEP mais sont par contre plus invasives car elles impliquent une procédure de ponction lombaire (Mantzavinos & Alexiou, 2017; Weller & Budson, 2018). Alors que certaines études montrent que la précision de diagnostic de ces marqueurs du LCR est plus faible que l'imagerie TEP, d'autres suggèrent une précision équivalente (Palmqvist et al., 2015). Une étude récente a étudié les agrégats solubles d'A β dans le LCR de patients contrôles, MA ou MCI, par des techniques d'imagerie super-résolution et a montré une différence dans la taille et la forme des agrégats entre ces groupes, suggérant que la pathologie pourrait aussi être suivie par cette méthode (De et al., 2019).

Enfin, d'autres tests reposant sur une mesure de la quantité de protéines A β et Tau circulantes dans le sérum sont actuellement étudiés (Weller & Budson, 2018).

Ainsi, de nombreuses méthodes sont disponibles ou en cours de développement pour améliorer le diagnostic de la MA mais il est important de noter que le diagnostic final peut seulement être validé en post-mortem.

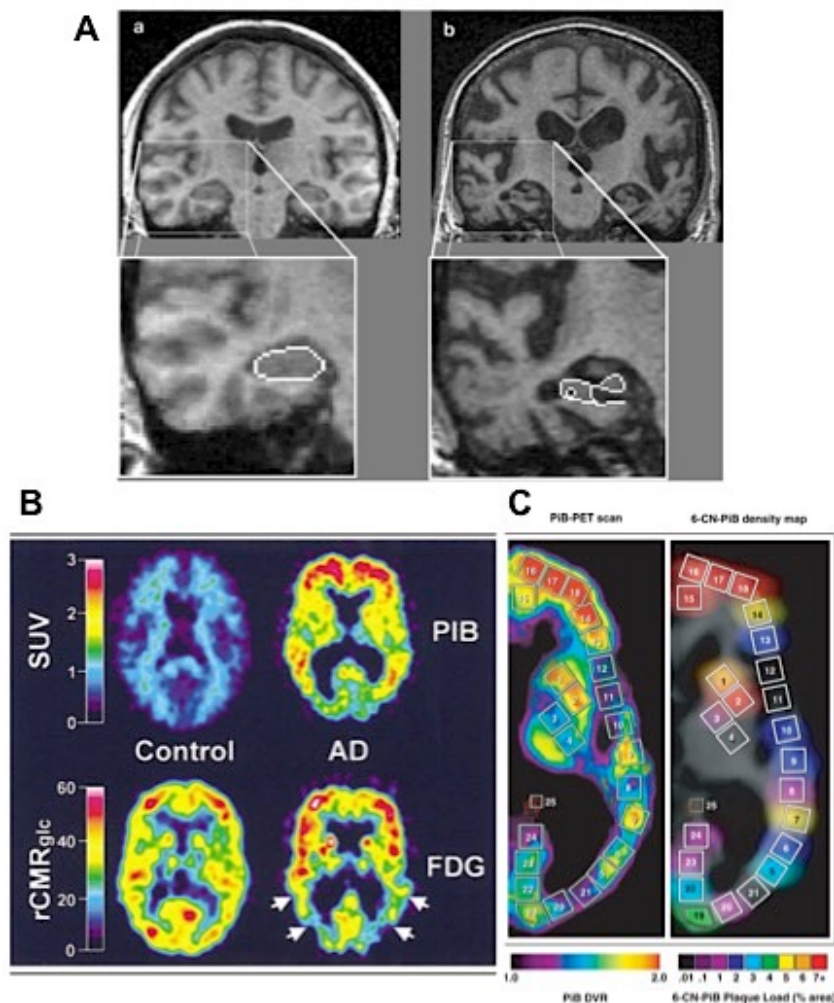


Figure 19. Biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer. A. Atrophie de l'hippocampe chez un patient atteint de la MA (droite) par rapport à un sujet contrôle (gauche) (Mosconi et al, 2005). B. Imagerie TEP des plaques amyloïdes par le PIB (haut) et imagerie TEP du [18F]-FDG montrant une fixation importante de PIB et un hypométabolisme cortical. (Klunk et al, 2004). C. Corrélation entre les signaux PIB en TEP (panneau gauche) et les dépôts A β en post-mortem (panneau droit). (Ikonomic et al, 2012).

1.3. Mécanismes pathologiques

Les causes de la MA ont longtemps été centrées sur les neurones et les observations histologiques de la maladie ont amenées à émettre l'hypothèse de la cascade amyloïde et la pathologie Tau. Depuis, de nouveaux partenaires cruciaux ont été impliqués au centre de cette maladie, les cellules gliales réactives.

Hypothèse de la cascade amyloïde

Cette hypothèse a été proposée pour la première fois par Hardy et Higgins en 1992 (Hardy & Higgins, 1992) et suggère que l'accumulation du peptide A β est la première cause des dysfonctions neuronales induisant une démence. Cette hypothèse repose sur deux découvertes principales : l'isolation de peptide A β par Glenner en 1984 et la découverte de mutations dans le gène de l'APP par Hardy et Higgins en 1991, puis sur la PS1 et PS2 (Makin, 2018). Brièvement, la cascade amyloïde est une hypothèse linéaire, supposant que l'agrégation de l'A β à partir de formes oligomériques, entraîne une cascade d'évènements conduisant à l'induction de la pathologie Tau puis aux altérations synaptiques, à la mort neuronale et *in fine* aux déficits cognitifs caractéristiques de la démence (Figure 20).

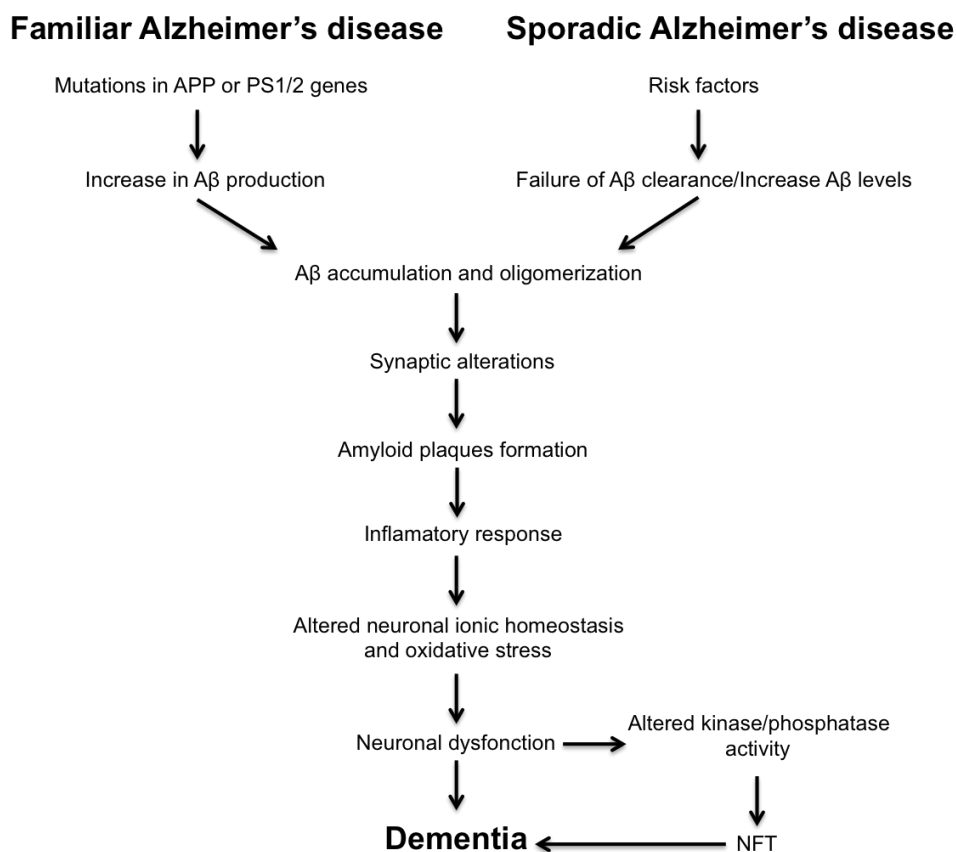


Figure 20. Hypothèse de la cascade amyloïde. (Hardy et Higgins, 1992).

Cette hypothèse est aujourd'hui très controversée pour plusieurs raisons. Premièrement, la présence de plaques amyloïdes chez des patients ne présentant aucun symptôme clinique (études en TEP) démontre que le lien entre les plaques amyloïdes et les déficits cognitifs n'est pas forcément causal. Deuxièmement, la progression de la pathologie amyloïde dans le cerveau ne corrèle pas parfaitement avec les symptômes des patients atteints de la MA puisque la pathologie s'initie dans le néocortex alors que la majorité des patients présentent des troubles de la mémoire dépendants de l'hippocampe dans les premiers stades de la maladie. Ces stades de progression de la pathologie amyloïde ont été établis par Thal et al (Thal et al., 2002) (Figure 21A). Enfin, plusieurs études sur les effets de

l'immunothérapie anti A β ont montrés que la diminution de la charge amyloïde dans le cerveau n'était pas corrélée à des améliorations cognitives (Makin, 2018).

Bien que largement débattue, la cascade amyloïde reste encore aujourd'hui à la base de différents essais cliniques (voir paragraphe III.1.3).

La pathologie Tau

En 1991, Braak et Braak ont établi différents stades de progression de la pathologie Tau qui s'initie dans le cortex transentorhinal (stades I et II) pour diffuser ensuite dans le système limbique, incluant l'hippocampe et le cortex entorhinal (stades III et IV) pour enfin atteindre l'ensemble du néocortex (stades V et VI) (Braak & Braak, 1991) (**Figure 21A**). Ces stades corrélaient mieux avec les déficits cognitifs de la maladie et avec la densité des plaques neuritiques que les stades de Thal, (Masters et al., 2015) (**Figure 21B**). Dans le LCR l'augmentation de la concentration de Tau totale et hyperphosphorylée corrélaient avec la réduction des scores de différents tests cognitifs.

La protéine Tau agrégée sous formes de NFT dans la MA va acquérir des fonctions toxiques en inhibant l'assemblage des microtubules et en perturbant le transport axonal. Ceci conduit à une neurodégénérescence axonale et dendritique (Querfurth & LaFerla, 2010). L'inhibition de ces fonctions toxiques fait l'objet de certaines études cliniques (voir paragraphe III.1.3).

Plus de 30 mutations de la protéine Tau ont été identifiées dans des cas de démence fronto-temporale, appartenant à la famille des tauopathies mais aucune mutation spécifique de la MA n'a été identifiée.

Ainsi, à elles seules, ni la pathologie amyloïde, ni la pathologie Tau ou l'interaction entre ces deux protéines n'expliquent les dysfonctions de l'activité synaptique et plus largement des réseaux neuronaux dans la MA, d'où l'importance de considérer d'autres acteurs comme les cellules gliales.

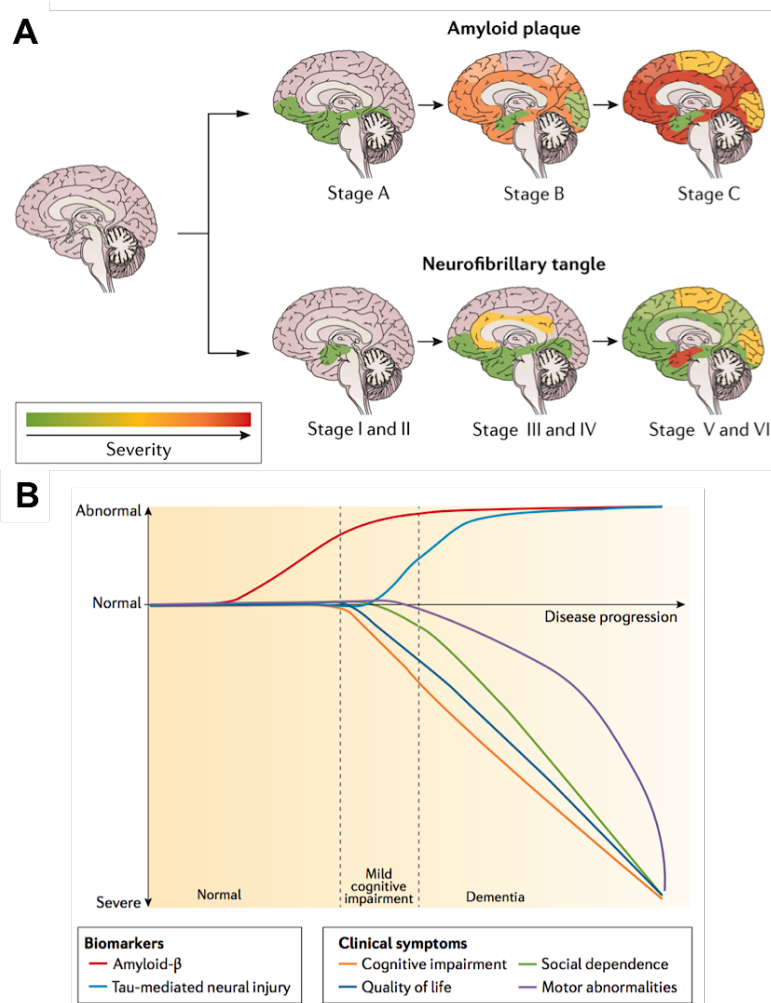


Figure 21. Propagation des plaques amyloïdes et de la pathologie Tau au cours de la MA et corrélation avec les symptômes cliniques. A. Propagation de la pathologie amyloïde selon les stades de Thal (Thal et al, 2002) et de la pathologie Tau selon les stades de Braak (Braak et Braak, 1991). B. Corrélation entre les symptômes cliniques et la progression de la pathologie Tau. Extrait de Masters et al, 2015.

Activation des cellules gliales et cellules immunitaires périphériques

Comme précédemment évoqué, l'activation des cellules gliales et des cellules immunitaires périphériques est un processus complexe. Dans les paragraphes suivants, je ne ferai qu'une brève description des différents acteurs impliqués et nécessaires à la compréhension de mon sujet de thèse (pour plus de détails, se référer aux revues suivantes : Arranz & De Strooper, 2019; Heneka et al., 2015; Sarlus & Heneka, 2017; Stephenson et al., 2018; Wang & Colonna, 2019; Yang & Zhou, 2019).

Comme largement discuté dans la partie II, les astrocytes sont des partenaires clés dans la physiologie cérébrale et ils deviennent réactifs en conditions pathologiques, ce qui est caractérisé par d'importantes modifications morphologiques, moléculaires et fonctionnelles. Dans la MA, ils sont principalement observés autour des plaques amyloïdes (Verkhatsky et al., 2016). De manière intéressante, certaines études montrent que la réactivité astrocytaire est observée avant l'apparition des plaques dans des modèles

murins de la MA (Rodríguez-Arellano et al., 2016). Chez l'Homme, plusieurs traceurs de TEP, encore à l'étude, sont utilisés pour détecter les astrocytes réactifs comme le [^{11}C]DED (Deutérium-L-deprenyl) se fixant à la monoamine oxydase B (MAO-B) qui est induite dans ces cellules. Ces études montrent que les astrocytes réactifs sont détectés à des stades précoces de la MA, voire même avant l'apparition des symptômes (Carter et al., 2019). Ces études ont même mené à proposer un modèle incluant les astrocytes réactifs parmi les autres biomarqueurs de la MA (Figure 22) (Carter et al., 2019). Enfin, il est aussi intéressant de noter que les données génétiques concernant les facteurs de risques associés à la MA incluent des gènes majoritairement exprimés dans les astrocytes comme le principal facteur de risque *ApoEε4* qui augmente le risque de 3 à 4 fois de développer la maladie par rapport à l'allèle $\epsilon2$. D'autres gènes majoritairement astrocytaires comme la Clusterine (*ApoJ*), une protéine chaperonne, ou *FERMT2*, un composant de la matrice extra-cellulaire, sont également des facteurs de risque (Arranz & De Strooper, 2019).

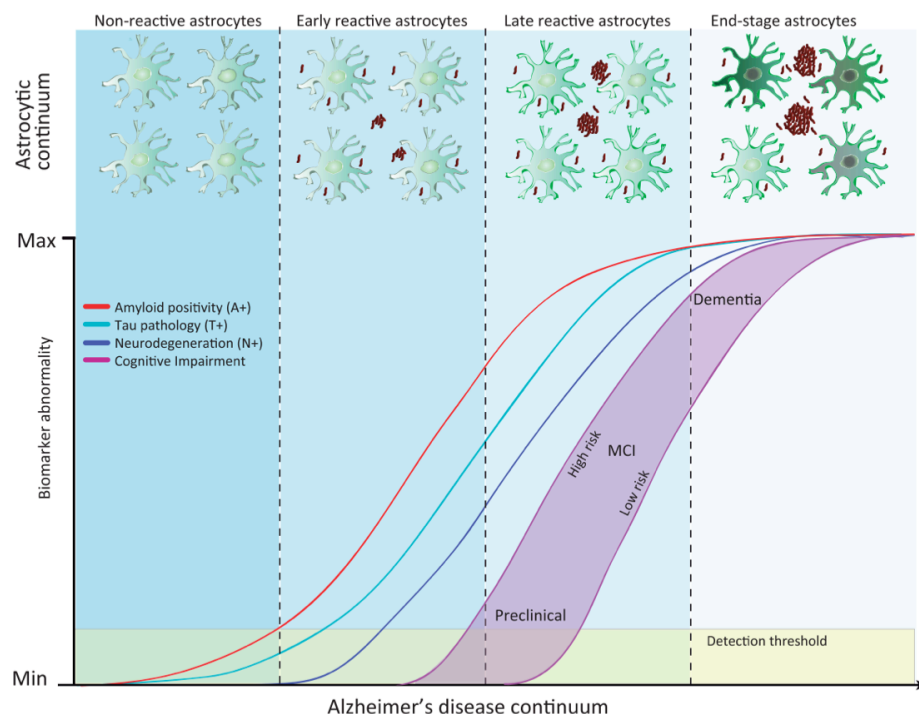


Figure 22. Modèle incluant les astrocytes parmi les autres biomarqueurs de la MA. Les astrocytes réactifs apparaissent à des stades précoces de la MA, voire même avant l'apparition des symptômes. Extrait de Carter et al, 2019.

Les cellules microgliales sont les cellules myéloïdes résidentes du SNC associées à de multiples fonctions homéostatiques. La microglie sécrète des cytokines et des facteurs du complément qui peuvent agir sur les cellules avoisinantes, en activant les astrocytes par exemple ou en favorisant l'élimination des synapses (Heneka et al., 2014; Hong & Stevens, 2016). Au cours du développement, la microglie participe en effet à la construction du réseau neuronal par phagocytose des connexions synaptiques excédentaires, processus dans lequel elles sont également impliquées à l'âge adulte au cours de la plasticité du réseau synaptique (Heneka et al., 2014). En condition pathologique, comme dans la MA, la microglie devient réactive. Tout comme pour les

astrocytes, cette réponse est caractérisée par d'importants changements morphologiques, moléculaires et fonctionnels. Au niveau morphologique, les prolongements microgliaux se réorganisent et se rétractent jusqu'à parfois adopter une morphologie amiboïde caractérisée par des prolongements fins et courts. Au niveau fonctionnel, les cellules microgliales réactives qui sont en contact avec les plaques amyloïdes augmentent leur sécrétion de cytokines et molécules du complément et diminuent leur dégradation des peptides A β (paragraphe III.2.7) (Sarlus & Heneka, 2017; Wang & Colonna, 2019).

De manière intéressante, plusieurs gènes spécifiques de la microglie sont associés à des facteurs de risque de la MA. Par exemple, une mutation sur le gène codant pour *TREM2*, un récepteur transmembranaire majoritairement microglial impliqué dans l'inflammation et la phagocytose, augmente de 3 à 5 fois le risque de développer tardivement la MA (Wang & Colonna, 2019). D'autres études montrent que certains variants de *TYROBP* (TYRO protein tyrosine kinase binding protein), un partenaire de *TREM2*, augmentent aussi le risque de développer une forme précoce de la MA (Pottier et al., 2016).

Enfin, il est intéressant de noter que comme les astrocytes réactifs, les microglies réactives sont hétérogènes. Initialement classées en 2 catégories, M1 pro-inflammatoire et M2 anti-inflammatoire (Varnum & Ikezu, 2012), il semble finalement que la réactivité microgliale soit un phénomène complexe et dépendant du contexte pathologique (Hirbec et al., 2019; Ransohoff, 2016). Au cours de la MA par exemple, l'étude de Keren-Shaul et al a mis en évidence une nouvelle catégorie de microglie, appelée DAM (Disease associated microglia) (Keren-Shaul et al., 2017). Ces DAM ont été identifiées dans des modèles murins de la MA mais également chez des patients. Cette étude montre que les DAM apparaissent via deux stades d'activation, le premier indépendant de *TREM2* et caractérisé par une signature génique spécifique (DAM de stade 1) et le deuxième stade, dépendant de *TREM2* et caractérisé par une autre signature génique (DAM de stade 2) (Keren-Shaul et al., 2017). Mais depuis, d'autres études ont montrées l'existence d'autres sous populations de microglie réactive, en particulier dans la MA (Friedman et al., 2018), suggérant que différentes sous-populations co-existent dans un même contexte pathologique. L'avènement des techniques de transcriptomiques sur cellules/noyaux uniques (Hirbec et al., 2020), a permis de confirmer l'hétérogénéité de la microglie réactive dans la MA, dans différents modèles murins (Mathys et al., 2017; Sala Frigerio et al., 2019) ou chez l'Homme (Mathys et al., 2019).

L'ensemble de ces études soulignent donc l'importance de la microglie et de son activation dans la MA.

Enfin, les cellules immunitaires périphériques jouent aussi un rôle dans la MA (pour une revue récente, Stephenson et al., 2018). En particulier, les cellules endothéliales formant la BHE sont sensibles à l'A β et ceci peut engendrer une modulation de la perméabilité de la BHE. Cette modulation entraîne l'entrée de différentes cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les cellules périphériques ou bien les cellules elles-mêmes (voir paragraphe III.2.5) (Liebner et al., 2018).

Une hypothèse émergente des causes de la MA, appelée l'hypothèse vasculaire, propose que l'hypoperfusion et l'hypoxie observées dans le cerveau pourraient être associées à une perturbation de la BHE, créant ainsi à la fois des problèmes de support métabolique pour les neurones et des problèmes de dégradation d'A β et de Tau (Arranz & De Strooper, 2019). A long terme, l'A β peut s'accumuler dans les vaisseaux sanguins et causer une angiopathie amyloïde cérébrale. Cette angiopathie est observée dans 80% des cas de la

MA et les stades de Thal décrivent 3 stades d'angiopathie, corrélés avec la formation des plaques (Thal et al., 2002).

Plus récemment, d'autres acteurs ont été impliqués dans la MA. Par exemple, les oligodendrocytes, responsables de la production de myéline dans le SNC et participant au support trophique et métabolique des axones, ont été montrés comme sensibles aux oligomères et aux fibrilles d'A β (Stephenson et al., 2018). Des altérations précoces de la myéline ont été observées chez des patients MA, suggérant un rôle délétère des oligodendrocytes produisant moins de myéline, ce qui altère *in fine* la transmission neuronale (Dean et al., 2017).

1.4. Traitements et essais cliniques

A ce jour, il n'y a pas de traitement curatif de la MA. Plus de 200 essais cliniques ont été conduits mais la majorité de ces études ont dû être arrêtées faute d'efficacité ou à cause d'effets secondaires délétères (Alzforum.org). Seuls des essais cliniques ciblant des traitements symptomatiques ont été approuvés.

Traitements symptomatiques

Parmi les traitements disponibles se trouvent majoritairement des molécules ciblant le système cholinergique (Donepezil, Galantamine, Rivastigmine), qui dégénère dans la MA. Ces molécules sont des inhibiteurs de la cholinestérase et préviennent donc la dégradation physiologique de l'acétylcholine, dans le but de compenser les déficits provenant de la mort neuronale. Ces molécules sont bien tolérées avec des effets secondaires liés aux effets mimétiques du système cholinergique sur le tractus gastrointestinal (nausées, vomissements, diarrhées). Elles améliorent la cognition des patients mais de manière modeste et seulement transitoire (Atri, 2019)

La dernière molécule disponible est la Mémantine, un antagoniste non compétitif des récepteurs au glutamate de type NMDA (N-méthyl D-aspartate) (affinité faible à modérée). Cette molécule bloque la suractivation de ces récepteurs observée chez les patients et prévient ainsi l'excitotoxicité. La Mémantine est relativement bien tolérée et provoque des effets secondaires de type maux de tête, constipation et somnolence. En terme d'efficacité, la molécule permet de diminuer les troubles du comportement social comme l'agressivité et l'irritabilité, ou bien de retarder leurs apparitions (Atri, 2019)

Ainsi, ces médicaments, bien qu'améliorant certains symptômes de la maladie, ne traitent pas sa cause et n'ont qu'un effet modéré sur le déclin cognitif des patients.

Essais cliniques en cours

La recherche thérapeutique est très active dans le champ de la MA et de nombreux essais cliniques sont menés en parallèle. La partie suivante résume de manière non exhaustive les principaux résultats récemment obtenus ainsi que les essais cliniques en cours (d'après l'article d'Alzforum, « a year of hope for Alzheimer's research »).

Largement étudiés depuis les premiers essais cliniques, les inhibiteurs de la γ -sécrétase ont rapidement été abandonnés à cause notamment de leurs non spécificités de la voie amyloïde (interaction avec la voie Notch) et leurs effets indésirables cutanés (Yan et al.,

2016). De nouvelles études ont ensuite évalué les effets de plusieurs inhibiteurs de la β -sécrétase qui ont une affinité moindre pour la voie Notch. Cependant, les résultats de ces études ont été publiés au cours de l'année 2019 et démontrent une inefficacité de ces molécules, voire même une détérioration de la cognition (Verubecestat, Umibecestat, Elenbecestat). Il est intéressant de noter que certaines de ces molécules ont échoué alors que leur spécificité pour la β -sécrétase était 3 fois plus élevée que les molécules précédemment étudiées. En effet, les premiers résultats négatifs sur les inhibiteurs de la β -sécrétase ont été attribués à leurs manques de spécificité (Yan et al., 2016).

Parmi les stratégies actuellement étudiées se trouve l'immunothérapie, qui consiste à utiliser des anticorps contre le peptide A β ou la protéine Tau hyperphosphorylée afin de prévenir leurs agrégations dans le cerveau. Certains de ces anticorps dirigés contre l'A β semblent induire un ralentissement du déclin cognitif, uniquement chez les patients ayant reçu une forte dose mais ces résultats nécessitent d'être davantage explorés (Aducanumab). D'autres immunothérapies anti amyloïdes sont actuellement en phase 3 (BAN2401, Gantenerumab et Solanezumab) et les premiers résultats montrent une normalisation des niveaux d'amyloïde dans le cerveau même après l'arrêt de la thérapie. En revanche, certains de ces anticorps se révèlent inefficaces (Crenezumab) et certaines études révèlent la présence d'une angiopathie amyloïde développée à la suite de l'immunothérapie chez certains patients (Morgan, 2011).

L'immunothérapie ciblant la protéine Tau est également en cours d'étude. Une absence d'effet a été montrée pour certains de ces anticorps dans une tauopathie, la paralysie supranucléaire progressive (ABBV-8E12 et Gosuranemab) et d'autres essais sont en cours sur la MA (ABBV-8E12, ACI-35 et AADvac1).

Enfin, des stratégies ciblant spécifiquement l'inflammation sont aussi étudiées mais certaines ont démontrées une inefficacité sur la cognition et des effets secondaires gastro-intestinaux et cardiovasculaires comme le naproxène, un anti-inflammatoire non stéroïdien. Les études en cours concernent principalement une thérapie génique ciblant ApoE ϵ 2 ou des anticorps ciblant TREM2 (AL002) ou CD33 (AL003).

1.5. Modèles murins utilisés en recherche préclinique

Il existe de nombreux modèles animaux pour étudier la MA. Certains modèles développent naturellement les lésions histologiques de la maladie. Par exemple, le rongeur *Octodon degus* présente des dépôts d'A β , une agrégation de Tau ainsi que des altérations de la mémoire à partir de 12 mois (Castro-Fuentes & Socas-Pérez, 2013). Certains primates non humains comme *Microcebus musculus* développent aussi parfois une pathologie amyloïde avec l'âge (Ezran et al., 2017). Cependant, l'étude de ce type de modèle nécessite des infrastructures d'hébergement adaptées, une expertise du comportement primate ainsi qu'une durée d'expérimentation longue. Les autres modèles disponibles sont principalement des modèles rongeurs génétiques (Esquerda-Canals et al., 2017; Jankowsky & Zheng, 2017), largement utilisés pour la facilité de mise en œuvre des expérimentations, reproduction et hébergement. De plus, ces modèles présentent une variété de constructions génétiques, permettant d'étudier différents aspects de la maladie comme la pathologie Tau et la pathologie amyloïde. Malheureusement un seul modèle ne récapitule pas tous les aspects de la pathologie humaine. Les modèles murins de la MA ont ainsi été caractérisés en utilisant de multiples tests comportementaux et marqueurs immunohistopathologiques afin de déterminer les caractéristiques spécifiques de chaque

modèle (Webster et al., 2014). Ces caractérisations permettent ainsi un choix du modèle animal en fonction de la question biologique (Jankowsky & Zheng, 2017).

Notre étude est centrée sur l'étude de deux modèles, les souris APP/PS1dE9 (APP) et les souris 3xTg-AD (3xTg), présentées de manière plus détaillées dans les paragraphes suivants.

Souris APP/PS1dE9

Le modèle APP/PS1dE9 (Jankowsky, et al., 2004) présente la mutation Swedish sur le gène humanisé de l'*APP*, correspondant à une mutation K595N/M596L, ainsi qu'une délétion de l'exon 9 sur le gène humain de la *PSEN1*. Ces deux gènes sont sous le contrôle du promoteur de la protéine Prion PrP. Ce modèle développe donc exclusivement la pathologie amyloïde.

Dans ce modèle, l'apparition des premières plaques amyloïdes se fait à l'âge de 6 mois et s'étendent dans le cortex et l'hippocampe à l'âge de 9 mois (Végh et al., 2014). Ce modèle développe aussi une réactivité des astrocytes et de la microglie, primordiale pour notre étude (Végh et al., 2014). Des altérations synaptiques sont observées dès l'âge de 6 mois (Volianskis et al., 2010), de même qu'une altération de la neurogénèse (Verret et al., 2007). Au niveau comportemental, des déficits de mémoire contextuelle ont été décrits à 6 mois (Kilgore et al., 2010) et des déficits de l'apprentissage et la mémoire spatiale à 10 mois (Volianskis et al., 2010).

Souris 3xTg-AD

Le modèle triple transgénique (3xTg-AD) (Oddo et al., 2003) présente la mutation M146V dans le gène murin de la *PSEN1* (Knock-in), la mutation Swedish sur le gène de l'*APP* (KM170/671NL) ainsi que la mutation P301L sur le gène de *Tau*. Les gènes mutés *APP* et *Tau* sont sous le contrôle du promoteur Thy-1, exclusivement neuronal. Ce modèle présente donc l'avantage de développer à la fois la pathologie amyloïde et la pathologie Tau, à l'image de la pathologie humaine.

Dans ce modèle, une accumulation intra-neuronale d'Aβ est observée dès 6 mois dans les neurones pyramidaux de la couche CA1 (Oddo et al., 2003). Les plaques amyloïdes apparaissent plus tardivement à l'âge de 12 mois dans l'hippocampe (Oddo et al., 2003). Alors que des formes hyperphosphorylées de Tau apparaissent à 8 mois dans l'hippocampe, les NFT ne sont détectés qu'à 15 mois dans cette région (Oddo et al., 2003). Tout comme la maladie humaine, la pathologie amyloïde apparaît donc avant la pathologie Tau. Ce modèle est également associé à réactivité des astrocytes et de la microglie, nette à l'âge de 12 mois même si des changements précoces ont été rapportés (Rodríguez et al., 2009). Avant l'apparition des plaques et des NFT, les souris présentent des déficits synaptiques et une altération de la neurogénèse à 6 mois (Oddo et al., 2003; Rodríguez et al., 2009). Au niveau comportemental, des déficits d'apprentissage et de mémoire apparaissent à l'âge de 9 mois (Clinton et al., 2007). Toutes les altérations précédemment décrites apparaissent plus précocement chez les femelles que les mâles (Clinton et al., 2007).

Ainsi l'utilisation de ces deux modèles de la MA est complémentaire et permet l'étude de différents aspects de la maladie.

2. Rôles des astrocytes réactifs dans la maladie d'Alzheimer

Au cours de la MA, de nombreuses altérations fonctionnelles sont observées dans les astrocytes (Arranz & De Strooper, 2019; Chun & Lee, 2018; Haim, Carrillo-de Sauvage, et al., 2015; Osborn et al., 2016; Perez-Nievas & Serrano-Pozo, 2018). Ces altérations, dont les principales sont détaillées dans les paragraphes suivants, pourraient contribuer aux dysfonctionnements neuronaux dans la MA.

2.1. Homéostasie du glutamate

Les astrocytes sont cruciaux pour le recyclage des neurotransmetteurs et en particulier celui du glutamate dans les synapses glutamatergiques. Une diminution de l'expression des transporteurs astrocytaires au glutamate GLT-1 a été observée dans des modèles murins de la MA et chez les patients, entraînant une diminution de la recapture du glutamate (E. Masliah et al., 1996; Eliezer Masliah et al., 2000). Plus récemment, une étude utilisant la microscopie multi-photonique *in vivo* et une sonde sensible au glutamate (iGluSnFR) a montré une augmentation des taux extracellulaires de glutamate autour des plaques amyloïdes chez les souris APP (Hefendehl et al., 2016). Cette augmentation corrèle avec une diminution de l'expression de GLT-1 dans les astrocytes réactifs entourant les plaques. L'administration intraveineuse de ceftriaxone, connu pour augmenter l'expression de GLT-1 dans les astrocytes, corrige ces déficits (Hefendehl et al., 2016). D'autres études montrent que l'exposition de coupes de cerveau de souris avec des oligomères d'Aβ solubles entraîne une diminution de l'expression des transporteurs dans les astrocytes par un mécanisme impliquant la voie CN/NFAT (Abdul et al., 2009) ou l'internalisation des transporteurs suite à un stress oxydatif (Scimemi et al., 2013). De manière intéressante, la réduction de l'expression de GLT-1 corrèle avec la progression de la MA dans le cerveau humain (Simpson et al., 2010). Il a récemment été proposé que l'absence de diminution de l'expression de GLT-1 dans les astrocytes pourrait être un mécanisme de résilience contre la MA (Kobayashi et al., 2018).

Les altérations du cycle glutamate/glutamine peuvent aussi contribuer à la neurotoxicité. En effet, une diminution des niveaux d'expression ou de l'activité de la GS a été montrée dans le cortex de patients (Le Prince et al., 1995) ainsi que le cortex préfrontal et l'hippocampe de souris 3xTg (Olabarria et al., 2011). La diminution de GS dans les astrocytes rendus réactifs par l'injection de virus codant pour la GFP dans l'hippocampe de souris, entraîne une déplétion en GABA et une hyperexcitabilité neuronale (Ortinski et al., 2010a). De manière intéressante, une étude montre que certains neurones pyramidaux augmentent leur expression de GS, comme un mécanisme compensatoire contre l'excitotoxicité du glutamate (Serrano-Pozo et al., 2013).

Ainsi, la diminution de la recapture du glutamate par les transporteurs astrocytaires associés à une altération du cycle glutamate/glutamine entraînent donc une augmentation des niveaux de glutamate dans la fente synaptique et par conséquent une excitotoxicité, favorisant la mort des neurones (Perez-Nievas & Serrano-Pozo, 2018).

2.2. Métabolisme énergétique

Métabolisme du glucose

Un hypométabolisme du glucose est observé de manière précoce dans la MA (paragraphe III.1.2). De façon intéressante, ces déficits corréleraient avec les altérations synaptiques observées dans la MA (Kisler et al., 2017). Le rôle des astrocytes réactifs dans ces déficits reste peu connu mais différentes anomalies de l'unité neurovasculaire peuvent expliquer cet hypométabolisme : gonflement et détachement des pieds astrocytaire, réduction de l'expression des transporteurs au glucose GLUT1 et réduction de l'expression de MCT1 entraînant une diminution de la libération de lactate (Kisler et al., 2017). Une étude récente montre l'implication de la L-sérine dans la MA (Le Douce et al., 2020). Il s'agit du précurseur de la D-sérine, un gliotransmetteur et co-agoniste des récepteurs NMDA. Les auteurs montrent que la voie de biosynthèse de la L-sérine est diminuée dans les souris 3xTg et chez l'Homme. De façon intéressante, la supplémentation en L-sérine par voie orale via l'alimentation, améliore les déficits synaptiques et les altérations mnésiques chez les souris 3xTg (Le Douce et al., 2020).

Métabolisme du cholestérol

Comme précédemment évoqué, les astrocytes expriment d'importants niveaux d'*ApoE* dont l'allèle $\epsilon 4$ est un facteur de risque majeur des cas sporadiques de la MA. Alors qu'*ApoE* est majoritairement impliqué dans le transport du cholestérol des astrocytes aux neurones en conditions physiologiques, *ApoE* $\epsilon 4$ semble jouer plusieurs rôles dans la pathologie amyloïde au cours de la MA (Huynh et al., 2017; Safieh et al., 2019) : En effet, il a été montré que les dépôts d'A β chez les patients porteur de cette mutation étaient plus nombreux par rapport aux individus porteurs d'autres mutations du gène (Dorey et al., 2014). Des études *in vitro*, principalement sur des cellules souches humaines pluripotentes induites, ont étudié les mécanismes sous-jacents et ont montré qu'*ApoE* $\epsilon 4$ favorise l'agrégation et le dépôt d'A β et diminue son élimination (Lin et al., 2018). De même, il a été montré que le cholestérol s'accumule dans les astrocytes (Lin et al., 2018). *ApoE* $\epsilon 4$ joue aussi un rôle dans la production d'A β en stimulant la transcription de l'*APP* (Huang et al., 2017). Au niveau fonctionnel, d'autres études *in vitro* montrent que les astrocytes *ApoE* $\epsilon 4$ perdent leur fonction neurotrophique et leur fonction de phagocytose des synapses (Chung et al., 2016; Lin et al., 2018; Jing Zhao et al., 2017).

2.3. Homéostasie ionique

Les astrocytes sont impliqués dans l'homéostasie du K⁺ via des canaux et transporteurs enrichis dans les pieds astrocytaire. L'étude transcriptomique d'Orre et al, montre une diminution de l'expression de différents canaux K⁺ comme Kir4.1 dans les astrocytes de souris APP/PS1dE9 (Orre, et al., 2014a). Cette diminution a aussi un impact sur la recapture de glutamate, elle-même dépendante des gradients K⁺ et Na⁺

(Danbolt et al., 2016). Par exemple, l'utilisation d'ARN interférents contre Kir4.1 sur des astrocytes en culture entraîne un dysfonctionnement de la recapture du glutamate (Kucheryavykh et al., 2007).

Le réseau astrocytaire relié par des jonctions gap, composées de Cx, est impliqué, entres autres, dans l'homéostasie du K^+ . Le réseau de Cx et le couplage astrocytaire sont modifiés dans la MA. L'expression de la Cx43 et la Cx30 sont par exemple augmentées autour des plaques amyloïdes dans le cortex de patients atteints de la MA (Nagy et al., 1996) ou dans des modèles murins de la MA (Mei et al., 2010). Néanmoins, les effets fonctionnels de la réactivité astrocytaire sur ces réseaux restent peu connus dans la MA (Yi et al., 2017).

Différentes études rapportent aussi une altération de l'homéostasie du Ca^{2+} dans les astrocytes réactifs au cours de la MA (Verkhratsky, 2019; Zorec et al., 2017). En particulier, la fréquence des oscillations Ca^{2+} spontanées est plus importante. Une hyper réactivité des courants Ca^{2+} mesurés à l'aide de sondes a aussi été montrée en imagerie bi-photonique sur les souris APP (Kuchibhotla et al., 2009; Reichenbach et al., 2018). Certaines vagues Ca^{2+} se propagent de manière radiale à partir des plaques amyloïdes (Delekate et al., 2014). De manière intéressante, ces anomalies sont observées en réponse à l'injection intraveineuse d'A β (Takano et al., 2007). Une dérégulation de l'homéostasie Ca^{2+} dans les astrocytes réactifs a une influence sur de multiples processus comme les cascades de signalisation intracellulaire, la protéolyse ou la libération de gliotransmetteurs (Osborn et al., 2016).

Ainsi la réactivité astrocytaire modifie de nombreuses fonctions liées à l'homéostasie cellulaire mais elle altère également le « sécrétome » des astrocytes c'est à dire l'ensemble des molécules libérées par les astrocytes et impliquées dans la communication avec les cellules voisines (Figure 23). Ces molécules libérées sont impliquées dans différents processus comme la signalisation avec les neurones via la libération de gliotransmetteurs, le support trophique ou encore la défense anti-oxydante.

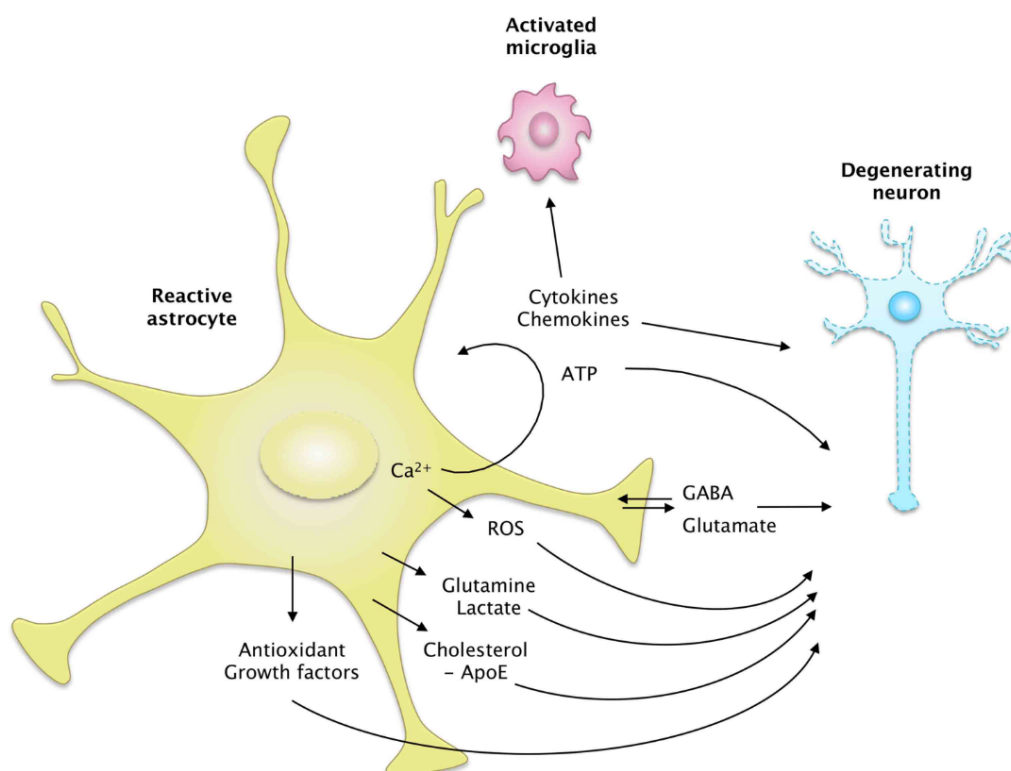


Figure 23. Sécrétome des astrocytes réactifs libérant de nombreuses molécules actives modulant les communications avec les cellules voisines. Extrait de Ben Haim et al, 2015. 72

2.4. Libération de gliotransmetteurs

Certaines des molécules libérées par les astrocytes comme le glutamate et le GABA sont des molécules neuroactives, on parle de gliotransmetteurs (Araque et al., 2014). Des altérations de la libération de gliotransmetteurs ont été mis en évidence dans la MA (**Figure 23**). Des études montrent qu'en réponse à l'A β , le glutamate est libéré par les astrocytes et peut activer des récepteurs NMDA extrasynaptiques, entraînant une dépression synaptique et une perte des épines dendritiques (Talanta et al., 2013). Dans un autre modèle murin de la MA, la libération de glutamate en réponse au TNF α est altérée, probablement à cause d'une altération des voies de signalisation sous-jacentes au TNF α (Rossi et al., 2005). Des études supplémentaires, *in vivo*, sont nécessaires pour déterminer l'impact de la réactivité sur la gliotransmission et ses effets sur la transmission synaptique.

Plus récemment, le rôle du GABA a été exploré dans la MA. En particulier, il a été montré que les astrocytes réactifs autour des plaques amyloïdes libèrent plus de GABA dans deux modèles murins de la MA (Jo et al., 2014; Wu et al., 2014). Le GABA est synthétisé par activation de la MAO-B à partir de la putrescine. L'étude de Jo et al, montre que l'augmentation des niveaux de la MAO-B entraîne une libération accrue de GABA dans l'espace extracellulaire, ce qui inhibe l'activité neuronale et altère les capacités mnésiques (Jo et al., 2014) (**Figure 24**). L'inhibition de la synthèse du GABA restaure ces déficits (Jo et al., 2014). Cette étude est corroborée par l'étude de Wu et al, montrant une inhibition tonique dans le gyrus denté de souris 5xFAD, un autre modèle murin de la MA (Wu et al., 2014). Le mécanisme proposé est différent et suggère une libération accrue du GABA par le transporteur astrocytaire GAT3/4 (GABA transporteur) dont le blocage pharmacologique restaure la plasticité synaptique et les déficits comportementaux (Wu et al., 2014) (**Figure 24**). De même que le glutamate, le rôle protecteur ou délétère du GABA produit par les astrocytes réactifs reste mal connu et nécessite d'être exploré.

Enfin les purines comme l'ATP et l'adénosine sont également des gliotransmetteurs libérés par les astrocytes. L'application d'A β sur des cultures d'astrocytes entraîne la libération d'ATP se propageant via les Cx43 (Jung et al., 2012; Orellana et al., 2011). Chez les souris APP/PS1dE9, l'ATP est aussi libéré par les astrocytes réactifs autour des plaques amyloïdes et agit sur les récepteurs P2Y1 en augmentant les concentrations de Ca²⁺ de manière autocrine (Delekate et al., 2014; Reichenbach et al., 2018).

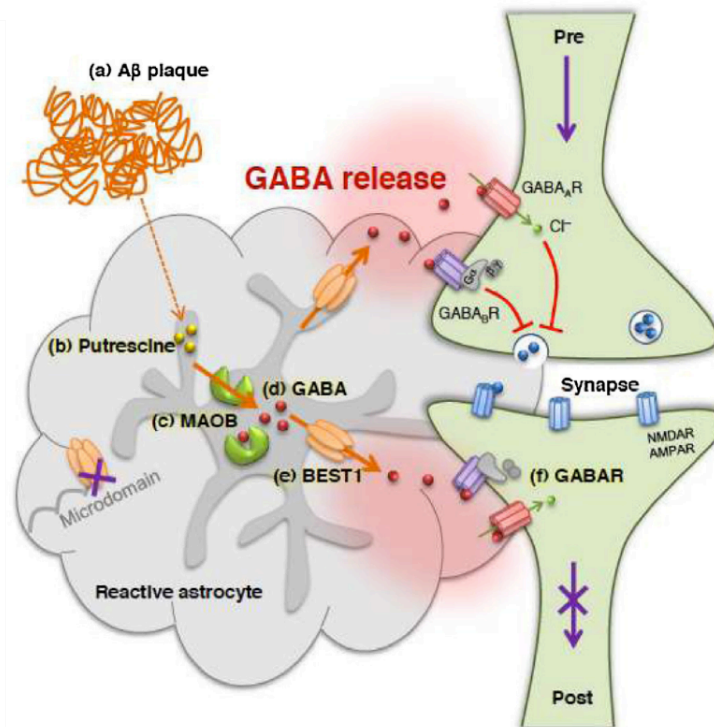


Figure 24. Modèle de la libération de GABA par les astrocytes réactifs dans la MA. Extrait de Chun et al, 2018.

2.5. Libération de cytokines et molécules inflammatoires

Comme vu précédemment (paragraphe III.1.2), une augmentation de la production des cytokines et chemokines, principalement produites par la microglie et les astrocytes réactifs, est observée dans la MA (Heneka et al., 2014). L'étude d'Orre et al, montre en effet une expression de différentes cytokines et chemokines par les astrocytes réactifs dans les souris APP (Orre, et al., 2014a). Certaines cytokines comme l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α , produites par les astrocytes et les microglies, ont plus particulièrement été étudiés dans les astrocytes réactifs au cours de la MA (Bagyinszky et al., 2017; Orre, et al., 2014a), notamment car elles agissent comme signal de recrutement pour les cellules immunitaires périphériques ou entraînent une modulation de la perméabilité de la BHE (Liebner et al., 2018). Par exemple, une étude in vitro a montré que l'expression de TNF- α par la microglie suite à une exposition à des peptides A β , favorise la migration des lymphocytes T au travers des cellules endothéliales via l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité I (Yang et al., 2013). D'autres chemokines comme CCL2 (Monocyte chemoattractant protein), majoritairement produite par les astrocytes, sont impliquées dans le recrutement de ces cellules. Une étude montre une surexpression de *ccl2* dans les formes intermédiaires de la MA mais pas chez les patients atteints d'une forme sévère (Galimberti et al., 2006). De même, CXCL10 est surexprimé dans les astrocytes réactifs de patients et est impliqué dans le recrutement des lymphocytes (Xia et al., 2000). Enfin, les cytokines et chemokines libérées par les astrocytes réactifs et la microglie activée peuvent altérer l'intégrité de la BHE pour y

laisser passer des facteurs inflammatoires libérés par les cellules du SNP (Desai et al., 2007). Les astrocytes réactifs et les microglies jouent donc un rôle dans le recrutement de cellules périphériques mais il est à nouveau difficile de distinguer le rôle des astrocytes réactifs et celui de la microglie.

Les astrocytes réactifs surexpriment aussi des molécules du complément dans la MA (Orre, et al., 2014a). En particulier, une accumulation des molécules du complément est observée au niveau des plaques et des NFT (Emmerling et al., 2000) ou dans des exosomes d'astrocytes de patients (Goetzl et al., 2018). Cette cascade peut être activée par l'A β et Tau via leur interaction avec C1q ou C3 (Jiang & Bhaskar, 2017; Morgan, 2018). Les rôles principaux de la cascade du complément sont la lyse des cellules, la production de molécules inflammatoires comme C3a ou la production d'opsonines, permettant de marquer les cellules à phagocyter (Jiang & Bhaskar, 2017; Morgan, 2018). Une étude a montrée que l'activation de la voie NF- κ B par l'A β induit une surexpression de C3 par les astrocytes capable de se fixer sur son récepteur C3a situé sur les neurones et la microglie. Cette fixation déclenche la voie du complément dans les neurones et altère la morphologie des dendrites, l'homéostasie calcique et les réponses à la synapse excitatrice. Dans la microglie, cette fixation altère leur capacité de phagocytose de l'A β (Lian et al., 2015, 2016a). De façon intéressante, l'inactivation du récepteur C3a diminue la pathologie Tau dans des modèles de tauopathie ou dans la MA (Litvinchuk et al., 2018).

2.6. Participation au stress oxydant

Les astrocytes sont primordiaux pour la défense contre les ROS car ils expriment un grand nombre d'enzymes et de transporteurs détoxifiants. L'expression de ces enzymes et transporteurs se fait via le facteur de transcription Nrf2 (NF-E2 related factor-2) (Allaman et al., 2011). Au contraire, en réponse à l'A β , les astrocytes réactifs libèrent des ROS comme le peroxide d'hydrogène, et deviennent alors toxiques pour les neurones (Allaman et al., 2011). Les astrocytes ont donc un effet double puisqu'ils sont capables à la fois de protection contre les ROS mais également de production de ROS. Des études montrent que cet effet est dépendant du niveau de production des ROS qui est corrélé avec les niveaux d'A β : plus il y a d'A β , plus il y a de dégradation oxydative et donc plus il y a de ROS (Narayan et al., 2014). A des faibles niveaux d'expression, les ROS activent eux mêmes les systèmes anti oxydants et ont donc des fonctions de neuroprotection (Wang et al., 2006). A l'inverse, des niveaux élevés de ROS entraînent la production de iNOS (oxyde nitrique synthase) induisant une toxicité pour les neurones (Bagheri et al., 2017).

2.7. Dégradation de l'A β

L'agrégation de protéines mal repliées, en particulier l'A β sous forme de plaques amyloïdes extracellulaires, est une caractéristique clé de la MA. Les astrocytes sont capables de dégrader l'A β par de nombreux mécanismes extra et intracellulaires.

Dégradation extracellulaire

Les astrocytes produisent certaines enzymes dégradant l'A β comme IDE (Insulin-degrading enzyme), NEP (Neprilysin), MMP2 (Matrix metalloproteinase) et MMP9. IDE et NEP sont des métalloendopeptidases dégradant majoritairement les formes monomériques d'A β et restent principalement produites par les neurones et la microglie (Hickman et al., 2008). MMP2 et MMP9 sont des métalloprotéinases produites par les astrocytes et la microglie et permettant de dégrader les formes monomériques et fibrillaires de l'A β (Yin et al., 2006). Toutes ces enzymes sont surexprimées chez les patients et modèles murins de la MA mais ce système pourrait être saturé avec la progression de la maladie (Yin et al., 2006).

La protéine chaperonne ApoE est également capable de lier l'A β au récepteur des lipoprotéines de faible densité. Ceci permet une élimination de l'A β via le système sanguin ou via les astrocytes (Koistinaho et al., 2004; Safieh et al., 2019). Néanmoins, ce processus est lui même impacté dans la MA (Koistinaho et al., 2004).

Enfin, l'élimination d'A β peut aussi se faire à travers le fluide interstitiel puis le LCR via un système de drainage paravasculaire impliquant les astrocytes. On parle de système glymphatique (Plog & Nedergaard, 2018).

Dégradation intracellulaire

Les protéines mal repliées sont dégradées par deux voies intracellulaires majeures : l'autophagie et le système ubiquitine/protéasome (UPS).

L'UPS a lieu dans le noyau et le cytoplasme des cellules et est responsable de la dégradation de 80% des protéines intracellulaires comme les protéines régulatrices à courte demi-vie et les protéines mal repliées ou endommagées (Wang & Le, 2019). La dégradation par l'UPS se fait en deux phases successives comprenant l'ubiquitination qui cible et marque les protéines à dégrader via l'activité de 3 enzymes consécutives (E1, E2 et E3) puis la dégradation par le protéasome, un complexe multimérique de protéases (Wang & Le, 2019). Des études *in vitro* et *in vivo* ont montrées que l'UPS est plus actif dans les cellules gliales que dans les neurones (Jansen et al., 2014; Tydlacka et al., 2008). Au cours de la MA, l'UPS est plus actif dans les astrocytes réactifs autour des plaques amyloïdes chez les patients et les souris APP (Orre, et al., 2014a) et peut dégrader l'A β mais aussi la β -sécrétase, diminuant ainsi la production d'A β (Hong et al., 2014). Cependant, l'UPS semble être saturé dans certaines conditions (Cao et al., 2019). Par exemple, une accumulation d'ubiquitine est observée au niveau des plaques amyloïdes, suggérant que le système n'a pas été au bout des étapes de dégradation (Perry et al., 1987).

L'autophagie est un mécanisme cellulaire uniquement présent dans le cytoplasme et responsable de la dégradation du matériel cytoplasmique de grande taille qui ne peut être pris en charge par le protéasome (organelles, agrégats protéiques, bactérie, etc) (Dikic, 2017). Il existe plusieurs formes d'autophagie dont la principale est la macroautophagie. Ce processus peut être divisé en 4 étapes successives : 1) initiation au cours de laquelle une double membrane, appelée phagophore se forme autour des éléments à dégrader, 2) élongation du phagophore qui se referme pour former un autophagosome, 3) fusion de l'autophagosome avec le lysosome pour former un autophagolysosome et enfin, 4) dégradation du contenu de l'autophagolysosome par des protéases lysosomales dont les cathepsines (Pierzynowska et al., 2018). Des protéines liées à l'autophagie comme Atg12 sont observées au niveau des plaques amyloïdes dans le cerveau de patients atteints de la MA (Ma et al., 2010). Le rôle des astrocytes réactifs

dans l'autophagie au cours de la MA est peu étudié. Seule une étude montre une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans l'autophagie dans les astrocytes d'un modèle murin de la MA (Pomilio et al., 2016). *In vitro*, les auteurs montrent que l'internalisation de l'A β est dépendante de l'autophagie (Pomilio et al., 2016). Une altération de l'autophagie a lieu au cours de la MA. Par exemple, une accumulation de vacuoles autophagiques a été décrite dans les neurites dystrophiques humain (Nixon et al., 2005) ou dans des modèles murins de la MA (Yu et al., 2005), suggérant un arrêt du processus avant la dégradation par les protéines lysosomales.

Dans la MA, les astrocytes jouent également un rôle dans la dégradation des peptides A β . Il a été montré dans plusieurs études *in vitro* et quelques études *in vivo* que les astrocytes sont capables de phagocytter les plaques amyloïdes et les peptides A β (Koistinaho et al., 2004; Wyss-Coray et al., 2003). Les vésicules contenant l'A β peuvent ensuite être dégradées par les lysosomes (Xiao et al., 2014). La phagocytose par les astrocytes réactifs est peu documentée et le rôle de la microglie dans ces processus reste prédominant. En effet, la microglie exprime de nombreux récepteurs capables de fixer l'A β comme les TLR (Li et al., 2012). Cette fixation entraîne une endocytose de l'A β qui peut ensuite être dégradé par les cathepsines lysosomales (Sarlus & Heneka, 2017). Ce phénomène est lui aussi impacté au cours de la MA ou une accumulation d'A β intracellulaire entraîne une libération de cytokines et de molécules pro-inflammatoires par la microglie (Sarlus & Heneka, 2017).

Enfin, le système du complément est impliqué dans la dégradation de l'A β . En effet, l'A β active la cascade du complément via sa liaison à C1q ou C3b sur la microglie, ce qui induit une phagocytose plus efficace (Lee & Landreth, 2010).

Les mécanismes de dégradation de l'A β par la microglie et les astrocytes réactifs sont donc variés et complexes et leurs rôles semblent être altérés au cours de la MA. Il est aussi intéressant de noter que les astrocytes réactifs pourraient aussi contribuer à la production d'A β en surexprimant la β -sécrétase (Oberstein et al., 2015; Zhao et al., 2011). Cette surexpression est observée à la fois chez des patients et dans des modèles murins de la MA mais les niveaux d'A β produits n'ont pas été déterminés (Oberstein et al., 2015; Zhao et al., 2011).

3. Rôles bénéfiques ou délétères des astrocytes réactifs dans la maladie d'Alzheimer ?

Ainsi, l'ensemble des études présentées montrent que les astrocytes réactifs sont impliqués dans la physiopathologie de la MA via de nombreuses fonctions. Globalement, la réactivité astrocytaire implique un gain de fonctions délétères et une perte des fonctions de support et des fonctions neuroprotectrices des astrocytes. Cependant, certains rôles comme l'élimination des peptides A β ainsi que la détoxification des ROS semblent être plutôt neuroprotecteurs. Les effets fonctionnels bénéfiques ou délétères des astrocytes réactifs reste donc controversés dans la MA (Figure 25).

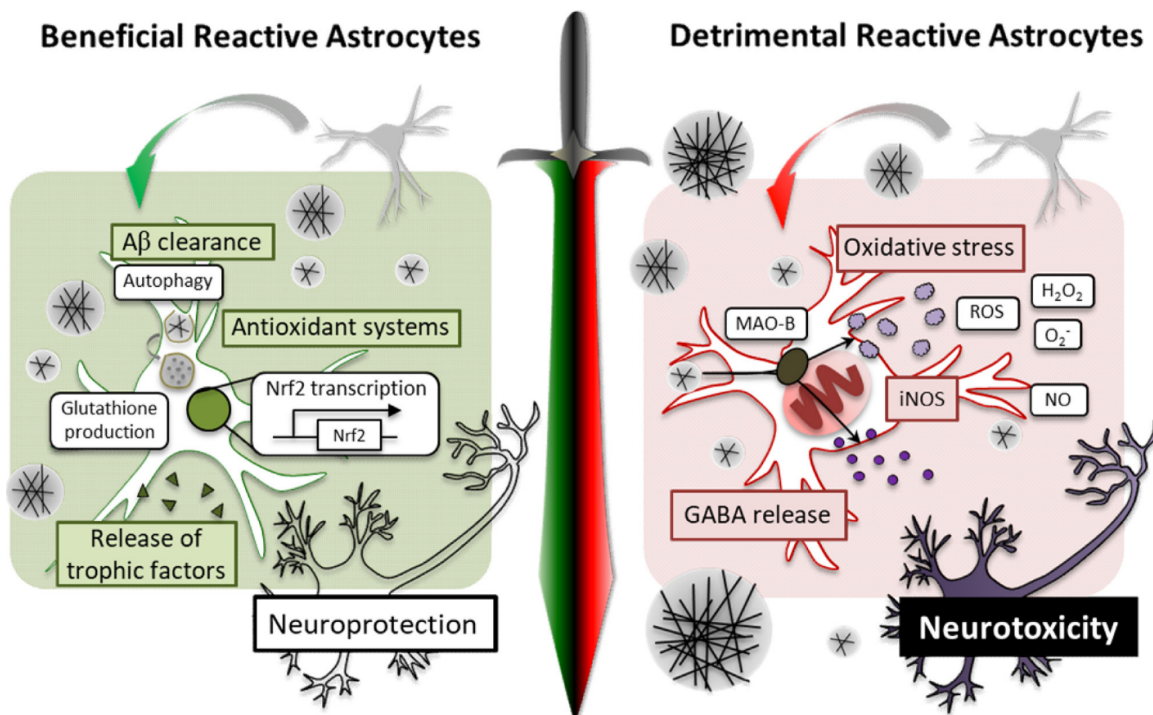


Figure 25. Rôles bénéfiques et délétères des astrocytes réactifs dans la MA : une épée à double tranchant. Plusieurs fonctions des astrocytes réactifs sont altérées au cours de la MA comme la libération de GABA et la libération de ROS alors que d'autres fonctions sont plutôt protectrices comme la dégradation des peptides Aβ et les systèmes de défense contre le stress oxydant. Néanmoins, à fort taux d'Aβ, ces systèmes deviennent saturés. Extrait de Chun et al, 2018.

Afin d'évaluer le rôle des astrocytes réactifs dans la MA, différentes stratégies ont été utilisées pour interférer globalement avec la réactivité astrocytaire. Cependant, ces études, dont certaines seront détaillées dans le paragraphe suivant, montrent des effets non-concordants en fonction de la stratégie utilisée pour moduler la réactivité. Il est en effet important de noter que l'étude de cette question nécessite des stratégies qui impactent l'état réactif des astrocytes mais pas ses fonctions en conditions physiologiques et surtout des stratégies qui sont sélectives des astrocytes réactifs mais qui n'affectent pas les autres types cellulaires.

Parmi les stratégies utilisées, les premières ont étudié les effets d'un KO des protéines des filaments intermédiaires GFAP et Vimentine (Kamphuis et al., 2015; Kraft et al., 2013) mais les effets sur différents index de la MA ne sont pas concordants. Alors que l'étude de Kraft et al, montre une augmentation de la charge amyloïde et des neurites dystrophiques, l'étude de Kamphuis et al, montre une absence d'effets sur la pathologie amyloïde. Cependant, le KO de ces protéines impacte de nombreuses fonctions physiologiques des astrocytes et induit de multiples changements transcriptionnels aussi chez les souris WT (Kamphuis et al., 2015). Cette approche ne semble donc pas être adaptée à l'étude des astrocytes réactifs dans la MA, d'autant que l'absence d'un marqueur classique de la réactivité comme la GFAP ne témoigne pas forcément d'une absence de réactivité.

Une autre stratégie consiste à moduler les voies de signalisation impliquées dans la réactivité astrocytaire. Certaines études ont modulées la voie CN/NFAT (Fernandez et al., 2012; Furman et al., 2012; Sompol et al., 2017). Les études de Furman et al et

Sompol et al montrent que l'inhibition de la réactivité par blocage de la voie CN/NFAT via le peptide VIVIT entraîne une diminution de la charge amyloïde et une amélioration des déficits cognitifs, ce qui suggère un rôle délétère des astrocytes réactifs dans la MA (Furman et al., 2012; Sompol et al., 2017). L'utilisation d'une forme constitutivement active de la CN montre des résultats similaires (Fernandez et al., 2012). Ainsi, les mécanismes d'implication de cette voie dans la réactivité restent mal connus. De plus, le peptide VIVIT utilisé manque de spécificité et de sélectivité puisqu'il peut être sécrété par les neurones, n'excluant donc pas leur implication dans les effets fonctionnels observés dans cette étude. D'autre part, la séquence du peptide a été identifiée sur d'autres substrats de la CN (Li et al., 2011), suggérant une interaction avec d'autres voies que la voie CN/NFAT étudiée.

Une étude récente a modulé la réactivité astrocytaire par délétion conditionnelle de STAT3 spécifiquement dans les astrocytes de souris APP et a montrée une diminution de la charge amyloïde associée à une meilleure dégradation des peptides A β par la microglie et une amélioration de l'apprentissage et la mémoire spatiale (Reichenbach et al., 2019). L'injection d'un inhibiteur systémique de STAT3 pendant 6 semaines améliore aussi les déficits mnésiques (Reichenbach et al., 2019). Cependant, les auteurs montrent eux mêmes que la délétion de STAT3 n'est pas totale, n'excluant donc pas des effets compensatoires de STAT3 restant. Les inhibiteurs systémiques manquent quant à eux de sélectivité puis qu'ils peuvent agir sur différents types cellulaires, y compris périphériques.

Ces études montrent donc majoritairement un rôle délétère des astrocytes réactifs dans la MA mais certains effets sur la pathologie demeurent non concordants. Cela souligne la nécessité de cibler une voie de signalisation centrale et spécifique de la réactivité astrocytaire afin d'étudier le rôle des astrocytes réactifs dans la MA.

IV. Problématique et objectifs de la thèse

Ce projet de thèse est divisé en 3 parties. Les 2 premières parties, correspondant à des articles publiés, et avaient pour objectif de déterminer **le rôle des astrocytes réactifs dans deux modèles murins de la MA**. En effet, comme montré dans le paragraphe précédent, l'impact global de la réactivité astrocytaire dans la MA est controversé et nécessite des approches plus sélectives et spécifiques des astrocytes réactifs pour étudier leurs contributions. Pour cela, nous avons 1) établi l'importance de la voie JAK2-STAT3 dans la réactivité astrocytaire au cours de la MA et 2) évaluer les effets de la modulation de la réactivité astrocytaire par cette voie sur différents index de la MA dans les souris APP/PS1dE9 (**Article 1**) et 3xTg-AD (**Article 2**).

La 3^{ème} partie de la thèse consiste à étudier l'hétérogénéité des astrocytes réactifs dans les souris APP/PS1dE9. Les études récentes suggèrent en effet que la réactivité astrocytaire est une réponse hétérogène associée à une diversité moléculaire et fonctionnelle. Cette hétérogénéité souligne ainsi la nécessité de ré-aborder le rôle des astrocytes réactifs dans la MA en considérant l'existence de classes d'astrocytes réactifs qui pourraient influencer différemment les neurones environnants. Cependant, les signaux et cascades de signalisation qui contrôlent une telle diversité ne sont, à ce jour, pas identifiés et on ne sait pas comment les différentes classes d'astrocytes réactifs sont générées. Nous émettons donc l'hypothèse que les différentes classes d'astrocytes sont contrôlées par des cascades de signalisation distinctes conditionnant l'acquisition d'un profil moléculaire unique avec des gènes contrôlant des fonctions spécifiques à chaque classe. Ce 3^e projet présente donc 3 objectifs majeurs : 1) identifier les cascades de signalisation activées dans différentes classes d'astrocytes réactifs, 2) caractériser le profil transcriptionnel de ces classes et 3) déterminer les caractéristiques fonctionnelles de ces classes.

Résultats

I. La modulation de la réactivité astrocytaire améliore des déficits fonctionnels dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer

Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease – *Acta neuropathologica communications* – 2018 – *doi: 10.1186/s40478-018-0606-1*.

Kelly Ceyzériat, Lucile Ben Haim*, Audrey Denizot*, Dylan Pommier*, Marco Matos*, **Océane Guillemaud***, Marie-Ange Palomares, Laurene Abjean, Fanny Petit, Pauline Gipchtein, Marie-Claude Gaillard, Martine Guillermier, Sueva Bernier, Mylène Gaudin, Gwenaëlle Aurégan, Charlene Joséphine, Nathalie Déchamps, Julien Veran, Valentin Langlais, Karine Cambon, Alexis P Bemelmans, Jan Baijer, Gilles Bonvento, Marc Dhenain, Jean-François Deleuze, Stéphane H R Olié, Emmanuel Brouillet, Philippe Hantraye, Maria-Angeles Carrillo-de Sauvage, Robert Olasso, Aude Panatier and Carole Escartin.

* Contributions égales.

1. Contexte, objectif et synthèse de l'article 1

Au cours de la maladie d'Alzheimer, les astrocytes deviennent réactifs. Cette réponse est caractérisée principalement par des altérations morphologiques. Cependant, celles-ci ne fournissent pas beaucoup d'informations sur le fonctionnement des astrocytes en condition de réactivité. Quand l'équipe a initié ces études, l'implication des astrocytes réactifs dans la maladie d'Alzheimer était très controversée. Ces résultats contradictoires pouvaient s'expliquer par un manque d'efficacité et de sélectivité des approches utilisées et les différents modèles animaux étudiés, présentant des contextes pathologiques spécifiques. Les objectifs de cette étude étaient donc de 1) démontrer l'importance de la manipulation de la voie JAK2-STAT3 pour contrôler la réactivité astrocytaire et 2) évaluer la contribution des astrocytes réactifs sur différents index de la pathologie.

Notre équipe a développé des vecteurs viraux permettant de moduler spécifiquement, dans les astrocytes *in vivo*, la voie JAK2-STAT3 (voir paragraphe II.3.2 de l'introduction), une voie importante dans les processus de réactivité (Ben Haim et al., 2015). Dans cette étude, nous montrons que la surexpression de SOCS3, inhibiteur endogène de la voie JAK2-STAT3, diminue des marqueurs de réactivité comme la GFAP ou la Vimentine dans le modèle murin de la MA, les souris APP/PS1dE9 (appelées par la suite APP) (Jankowsky, Fadale, et al., 2004b). Des vecteurs viraux permettant d'amplifier la réactivité astrocytaire par surexpression d'une forme constitutivement active de JAK2 (JAK2ca) ont également été développés. La surexpression de JAK2ca dans l'hippocampe de souris WT suffit à induire une augmentation des marqueurs de réactivité, en absence de tout contexte pathologique. Nous montrons également que le blocage de la voie JAK2-STAT3 chez les souris APP restaure non seulement les changements morphologiques liés à la réactivité mais également leur profil transcriptionnel. Il est aussi intéressant de noter que SOCS3 diminue l'expression de marqueurs d'astrocytes réactifs de type A1 et A2.

Après avoir démontré l'efficacité du ciblage de la voie JAK2-STAT3 pour induire et contrôler à long terme la réactivité, nous avons évalué l'effet de la modulation de la réactivité astrocytaire sur différents index pathologiques de la maladie d'Alzheimer chez

les souris APP. Nous avons mis en évidence des effets bénéfiques de SOCS3 sur la charge amyloïde. Des effets en miroir ont été obtenus avec JAK2ca. Nous avons également mis en évidence une amélioration de l'apprentissage spatial chez les souris APP injectées avec SOCS3 dans l'hippocampe. Enfin, le ciblage de la voie dans un autre modèle de la maladie, les souris 3xTg-AD (appelées par la suite 3xTg) améliore la transmission et la plasticité synaptique. A l'inverse, l'activation de la voie par JAK2ca dans l'hippocampe de souris WT suffit à induire des altérations neuronales semblables à celles observées dans la maladie d'Alzheimer, comme une altération de la LTP.

Ces données soulignent donc l'importance de la voie JAK2-STAT3 dans le contrôle de la réactivité astrocytaire dans la maladie d'Alzheimer. La modulation de cette voie astrocytaire dans le modèle APP révèle un rôle plutôt délétère des astrocytes réactifs.

2. Contributions à l'article 1

Cet article rassemble plusieurs études complémentaires menées dans l'équipe. Mon travail dans cet article a consisté à réaliser les expériences et analyses comportementales (Figure 5) ainsi que des analyses histologiques de validation de l'induction de la réactivité avec JAK2ca dans les souris WT (Figure 7). J'ai également participé à la réalisation des figures et la relecture du manuscrit.

3. Conclusions

Le ciblage de la voie JAK2-STAT3 est efficace pour inhiber ou amplifier la réactivité astrocytaire en contrôlant des caractéristiques morphologiques et transcriptionnelles clés des astrocytes réactifs. Les outils viraux développés permettent donc d'étudier le rôle des astrocytes réactifs dans la maladie d'Alzheimer. Notre étude révèle un rôle délétère des astrocytes réactifs sur la charge amyloïde, l'apprentissage spatial ainsi que les dysfonctions synaptiques.

Cet article est discuté en discussion générale afin de faire le lien entre les différentes études publiées et nos résultats non publiés présentés dans la dernière partie de la thèse (voir page 104).

4. Article 1

RESEARCH

Open Access



Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease

Kelly Ceyzériat^{1,2}, Lucile Ben Haim^{1,2,8†}, Audrey Denizot^{3,4†}, Dylan Pommier^{3,4†}, Marco Matos^{3,4†}, Océane Guillemaud^{1,2†}, Marie-Ange Palomares⁵, Laurene Abjean^{1,2}, Fanny Petit^{1,2}, Pauline Gipchtein^{1,2}, Marie-Claude Gaillard^{1,2}, Martine Guillermier^{1,2}, Sueva Bernier^{1,2}, Mylène Gaudin^{1,2}, Gwenaëlle Aurégan^{1,2}, Charlène Joséphine^{1,2}, Nathalie Déchamps^{6,7}, Julien Veran^{3,4}, Valentin Langlais^{3,4}, Karine Cambon^{1,2}, Alexis P Bemelmans^{1,2}, Jan Baijer^{6,7}, Gilles Bonvento^{1,2}, Marc Dhenain^{1,2}, Jean-François Deleuze⁵, Stéphane H R Olié^{3,4}, Emmanuel Brouillet^{1,2}, Philippe Hantraye^{1,2}, Maria-Angeles Carrillo-de Sauvage^{1,2}, Robert Olasso⁵, Aude Panatier^{3,4} and Carole Escartin^{1,2*} 

Abstract

Astrocyte reactivity and neuroinflammation are hallmarks of CNS pathological conditions such as Alzheimer's disease. However, the specific role of reactive astrocytes is still debated. This controversy may stem from the fact that most strategies used to modulate astrocyte reactivity and explore its contribution to disease outcomes have only limited specificity. Moreover, reactive astrocytes are now emerging as heterogeneous cells and all types of astrocyte reactivity may not be controlled efficiently by such strategies.

Here, we used cell type-specific approaches *in vivo* and identified the JAK2-STAT3 pathway, as necessary and sufficient for the induction and maintenance of astrocyte reactivity. Modulation of this cascade by viral gene transfer in mouse astrocytes efficiently controlled several morphological and molecular features of reactivity. Inhibition of this pathway in mouse models of Alzheimer's disease improved three key pathological hallmarks by reducing amyloid deposition, improving spatial learning and restoring synaptic deficits.

In conclusion, the JAK2-STAT3 cascade operates as a master regulator of astrocyte reactivity *in vivo*. Its inhibition offers new therapeutic opportunities for Alzheimer's disease.

Keywords: Reactive astrocytes, Alzheimer's disease, JAK2-STAT3 pathway, Signaling cascades, Viral vectors, Neuroinflammation, Mouse models

Introduction

Astrocytes become reactive in virtually all diseases of the central nervous system (CNS). Astrocyte reactivity is classically defined by two hallmarks: cellular hypertrophy and overexpression of intermediate filament proteins

such as Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) and vimentin [27]. But astrocyte reactivity involves significant transcriptional changes that go well beyond these two morphological alterations, and the functional consequences of reactivity are unclear [7, 9, 47, 67]. In Alzheimer's disease (AD), the most frequent neurodegenerative disease (ND) characterized by amyloid and Tau deposition in the brain, as well as memory loss and synaptic alterations, the role of reactive astrocytes is still debated [13, 63].

Studies in cellular or mouse models of AD report changes in specific astrocyte functions, including metabolic support [2, 72], neurotransmitter recycling [51],

* Correspondence: carole.escartin@cea.fr

[†]Lucile Ben Haim, Audrey Denizot, Dylan Pommier, Marco Matos and Océane Guillemaud contributed equally to this work.

¹Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Département de la Recherche Fondamentale, Institut de Biologie François Jacob, MIRCen, 92260 Fontenay-aux-Roses, France

²Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris-Sud, UMR 9199, Neurodegenerative Diseases Laboratory, 92260 Fontenay-aux-Roses, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

antioxidant defense [2, 83] and synaptic transmission [31, 45]. However, the overall contribution of reactive astrocytes to AD remains unclear, because the changes reported in these studies can have beneficial, detrimental or mixed effects on neurons. Attempts to block astrocyte reactivity globally, through knock-out of astrocyte intermediate filament proteins [32, 38] or inhibition of intracellular signaling cascades [22, 77] show inconsistent effects on AD pathological outcomes. Such discrepancies could stem from the low efficiency and selectivity of these approaches that only impact astrocyte morphological changes or have partial effects on astrocyte reactivity. In addition, they may not target all reactive astrocyte populations. Indeed, reactive astrocytes display molecular and functional heterogeneity [3]. For example, two sub-types of reactive astrocytes termed A1 and A2 were recently described [48, 85]. Likewise, in AD, astrocytes in contact with amyloid plaques display stronger transcriptional changes than those distant to plaques [62]. To understand how reactive astrocytes contribute to AD, it is crucial to develop a new strategy that efficiently modulates all types of reactive astrocytes.

Several intracellular signaling cascades are traditionally associated with astrocyte reactivity in acute or chronic diseases, but it is not clear whether they directly control it *in vivo* see, [7, 33] for review. Recently, we showed that the transcription factor Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) is activated in reactive astrocytes of several murine and primate ND models [8]. It is also activated in acute CNS diseases and is involved in the formation of the glial scar [4, 26, 61]. STAT3 is the downstream effector of the Janus Kinase 2 (JAK2)-STAT3 pathway. In this cascade, the binding of several cytokines and growth factors to their receptors activate JAK2, leading to phosphorylation and nuclear accumulation of STAT3 [54]. STAT3 then activates the expression of multiple target genes, including GFAP in astrocytes [12, 54].

In this study, we aimed to 1) demonstrate the instrumental role of the JAK2-STAT3 pathway in controlling astrocyte reactivity in AD and 2) target this pathway to modulate astrocyte reactivity and evaluate its contribution to disease outcomes in AD mouse models. We establish that the JAK2-STAT3 pathway is a master regulator of astrocyte reactivity *in vivo*. It is necessary and sufficient for the induction and long-term maintenance of reactive astrocytes. Importantly, its inhibition blunts astrocyte reactivity, reduces amyloid deposition, improves spatial learning and restores synaptic function in AD mouse models, revealing that reactive astrocytes have mostly deleterious roles in AD.

Methods

Mice

Male APP/PS1dE9 transgenic mice (APP; <http://jaxmice.jax.org/strain/005864.html>) were injected at 3–

4 month-old and studied 6 months later. Another cohort was injected at 15 month-old and studied 1 month later. APP mice harbor a chimeric mouse/human *App* gene with the Swedish mutations K595N and M596L (APP^{swe}) and the human *Psen1* variant lacking exon 9 on a C57BL/6 J background [30]. Non-transgenic littermates were used as controls. Female triple transgenic (3xTg) mice express human APP^{swe} and human Tau^{P301L} under a Thy-1 promoter as well as a point mutation on the mouse *Psen1* gene (PS1^{M146V}), on a mixed C57BL/6 J x 129Sv background [59]. C57BL/6 J x 129Sv mice were used as controls. They were injected at 3 month-old and studied at 8–9 month-old. Breeding pairs were obtained from the Mutant Mouse Regional Resource Centers. Finally, WT male C57BL/6 J mice were injected at 2 month-old and studied 1–4 months later. All experimental protocols were reviewed and approved by the local ethics committee (CETEA N°44) and submitted to the French Ministry of Education and Research (Approvals # APAFIS#4565–2016031711426915 v3, APAFIS#4503–2016031409023019). They were performed in a facility authorized by local authorities (authorization #B92–032–02), in strict accordance with recommendations of the European Union (2010–63/EEC). All efforts were made to minimize animal suffering and animal care was supervised by veterinarians and animal technicians skilled in rodent healthcare and housing. Animals were housed under standard environmental conditions (12-h light-dark cycle, temperature: 22 ± 1 °C and humidity: 50%) with *ad libitum* access to food and water. Mice of the appropriate genotype were randomly allocated to experimental groups.

Viral vectors

We used adeno-associated virus (AAV2, serotype 9) that bear the gfaABC₁D promoter, a synthetic promoter derived from the GFAP promoter [43], to drive specific transgene expression in astrocytes (Additional file 1: Figure S1). AAV were produced by our viral vector facility according to validated procedures [21]. Viral genome concentration in the vector batch was determined by qPCR on DNase resistant particles.

To modulate the JAK2-STAT3 pathway in mouse astrocytes, we generated AAV encoding murine SOCS3 or murine JAK2^{T875N}, a constitutive active form of JAK2 (JAK2ca, [23]). Control viral vectors encoded GFP. AAV-SOCS3 or AAV-JAK2ca were co-injected with an AAV-GFP to visualize infected cells (same total viral titer). Depending on the experiment, bilateral injections of the same viruses were performed and controls were generated in different animals. Alternatively, the contralateral brain region was injected with the control virus and data analyzed with paired *t* test.

As a positive control for STAT1 immunoreactivity, we used mice injected with a lentiviral vector (LV) encoding the cytokine ciliary neurotrophic factor (CNTF), as previously described [18].

Stereotactic injections

Mice were anesthetized with an *i.p.* injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). For APP mice, xylazine was replaced by medetomidine (0.25 mg/kg) and anesthesia was reversed by an *s.c.* injection of atipamezole (0.25 mg/kg) at the end of the surgical procedure. Lidocaine (7 mg/kg) was injected subcutaneously at the incision site, 10 min prior to surgery. Mice received paracetamol in drinking water (1.6 mg/ml) for 48 h after surgery. Viral vectors were injected in the CA1 region of the hippocampus (coordinates from Bregma: anteroposterior (AP): -2, lateral (L): +/- 2; ventral (V): -1.2 mm from the dura; or more caudally as it improves viral diffusion AP: -3, L: +/- 3; V: -1.5 mm).

AAV were diluted in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) with 0.001% pluronic acid, at a final total concentration of 2.5×10^9 viral genome (VG)/ μ l. LV were diluted in PBS with 1% bovine serum albumin (BSA), at a total final concentration of 100 ng p24/ μ l. Between 2 and 2.5 μ l of viral suspensions were injected at a rate of 0.2 μ l/min.

As a positive control for phospho-ERK immunoreactivity, 2 month-old C57BL/6 mice received unilateral intrastratial injections of lipopolysaccharide (LPS) [1 μ l at 5 mg/ml in PBS (*Escherichia coli*, serotype 055:B5; Sigma)] and analyzed seven days later.

Immunohistology

Some mice were killed by an overdose of sodium pentobarbital (180 mg/kg) and perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) (Fig. 1h, 7). Alternatively, mice were killed by cervical dislocation and one brain hemisphere was rapidly dissected and drop-fixed in 4% PFA, while the other was used for biochemical analysis (Figs. 1b, 4, 6). In all cases, brains were post-fixed for 24 h in 4% PFA, cryoprotected in 30% sucrose solution and cut on a freezing microtome into 30 μ m-thick coronal sections. Series of slices were stored at -20 °C in an anti-freeze solution until used for immunostainings. All mice within a cohort were processed and analyzed in parallel with the exact same procedures.

Immunofluorescence. Slices were rinsed in PBS for 3 $\times$ 10 min and were blocked in 4.5% normal goat serum (NGS), 0.2% Triton X-100 in PBS (PBST) for 1 h at room temperature (RT). Slices were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies diluted in 3% NGS/PBST: anti-GFAP-Cy3 (1:1,000; Sigma, #C9205), anti-GFAP (1:1,000, Rabbit, Dako, Troy, MI, #Z0334), anti-IBA1 (1:500, Rabbit, Wako, Richmond,

VA, #019-19741), anti-MBP (1:500, Rabbit, Sigma, #M3821), anti-Olig2 (1:500, Rabbit, Millipore, #Ab9610), anti-S100 β (1:500, Mouse, Sigma #S2532) or anti-Vimentin (1:1,000, Chicken, Abcam, Cambridge, UK, #ab24525).

Slices were rinsed 3 $\times$ 10 min in PBS and incubated with secondary Alexa Fluor-conjugated antibodies (Invitrogen, Carlsbad, CA) in 3% NGS/PBST for 1 h at RT. After 3 washes in PBS, slices were incubated overnight at 4 °C with an anti-GFP biotinylated antibody (1:500, Vector Laboratories, Burlingame, CA, #BA-0702) in 3% NGS/PBST. After 3 rinses with PBS, sections were incubated for 1 h at RT with Streptavidine-FITC (1:1,000, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, #SA100-02) in 3% NGS/PBST. Slices were rinsed three times with PBS before being mounted on SuperFrost® Plus (ThermoFisher Scientific) slides and coverslipped with Fluorsave™ (Calbiochem, Darmstadt, Germany) or Fluormount™ (Sigma) medium.

For STAT3 and STAT1 stainings, slices were pre-treated with 100% methanol for 10 min at -20 °C and incubated with primary antibodies (STAT3 α , 1:200, Rabbit, #8768P; STAT1, 1:400, Rabbit, #14994, Cell signaling, Danvers, MA) in SignalStain® antibody diluent (Cell signaling, #8112 L) for 72 h at 4 °C. For NeuN (1:500, Mouse, Chemicon, Billerica, MA, #MAB377) and BAM10 (1:1,000, Mouse, Sigma, #A3981) stainings, the mouse on mouse kit (MOM, Vector Laboratories) was used to reduce non-specific background, according to the manufacturer's instructions. For Olig2 staining, a pre-treatment at 90 °C in Tris-EDTA Buffer pH = 9 (Diagnostic Biosystems, Pleasanton, CA) was performed. For *post-mortem* methoxy-XO4 (MXO4, Tocris, Bristol, UK) labeling, slices were incubated with 33 μ g/ml MXO4 in 0.1 M PBS, for 30 min at RT under mild agitation. After 3 rinses with PBS, a standard protocol for immunofluorescence was performed as described above. Double or triple immunofluorescent stainings were performed successively, with each antibody incubated alone.

Image analysis

GFAP immunoreactivity in the GFP⁺ area was quantified on 10 $\times$ -tiled images of the hippocampus acquired with an epifluorescence microscope (Leica, Nussloch, Germany). Virally transduced GFP⁺ area was manually segmented and the corresponding GFAP mean signal was measured with Image J. Background signal was measured on unstained areas and subtracted to the GFAP total signal. The number and individual surface of BAM10 or MXO4-labelled plaques in the whole hippocampus were quantified on 10 $\times$ -tiled fluorescent images with Image J. An automatic detection of objects with intensity and size thresholds was performed

on serial sections, after manual segmentation of the hippocampus on each section.

Images were acquired on a Leica TCS SP8 confocal microscope. Stacked confocal images (10 to 18 z-steps of 1 μm , kept constant within a cohort, maximum intensity stack) were acquired on 3 slices per animal and 3 fields on each slice with a 40 $\times$ objective. The number of vimentin⁺/GFP⁺ cells was manually counted in the GFP⁺ infected area, with Image J. STAT3⁺ cell bodies were manually segmented and the mean grey value for STAT3 IR was measured in each cell.

A Sholl analysis was performed on GFAP⁺ hippocampal astrocytes to quantify morphological parameters, with an Image J plugin [20] and defined radius parameters (starting: 5 μm ; ending: 100 μm ; step: 5 μm). GFAP immunofluorescent staining was detected with Image J threshold function on maximum projection confocal z-stack images (40 $\times$, average 12 steps, 1 mm step, zoom 1). This analysis requires detectable GFAP levels and therefore could not be conducted on APP-SOCS3 astrocytes that display very low GFAP expression.

For quantification of MXO4-labelled A β in microglia, stacks of 0.4 μm confocal images covering the entire height of the plaque were acquired on 15 MXO4⁺ plaques per animal (3–4 plaques/slice). The number of IBA1⁺ microglial cells in direct contact with MXO4⁺ plaques was counted manually in the acquired volume and the localization of MXO4⁺ material (membrane or soma) was determined.

Protein extraction

Mice were killed by an overdose of pentobarbital and their brains were rapidly collected. The GFP⁺ area was dissected out with a 1 mm diameter punch, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until protein extraction. Samples were homogenized by sonication in lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH=7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 with 1:100 phosphatase inhibitors (Sigma, cocktail 2) and 1X protease inhibitors (Roche, Basel, Switzerland); 25 μl /punch] centrifuged at 20,000 g for 20 min at 4°C . The supernatant contains Triton X-100-soluble proteins and was used for western blotting and MSD[®] ELISA tests.

Western blot

Protein concentration was measured by the BCA test (Pierce, Waltham, MA). Samples were diluted in loading buffer with DTT (NuPAGE[®] LDS sample buffer and sample reducing agent, Invitrogen). Ten μg of proteins was loaded on a NuPAGE[™] 4–12% Bis-Tris Midi Gel (Life Technologies). Migration was performed at 200 V for 45 min in NuPAGE[™] Running Buffer (Invitrogen) and proteins were transferred on a nitrocellulose membrane with

an iBlot Gel transfer device (Invitrogen). After 3×10 min rinses in Tris buffer saline and 0.1% Tween 20 (TBST), membranes were blocked in 5% milk in TBST for 1 h at RT and incubated for 3 h at RT, or overnight at 4°C with the following primary antibodies: 6E10 (human APP, 1:500, Mouse, Covance, Princeton, NJ, #SIG-39320-20), anti-Actin (1:5,000, Mouse, Sigma, #A2066), anti-ApoE (1:1,000, Rabbit, Abcam, #ab20874), anti-BACE1 (1:1,000, Rabbit, Cell signaling, #5606P), anti-GFAP (1:5,000, Rabbit, Dako), anti-IDE (1:400, Rabbit, Abcam, #ab32216), and anti-Tubulin α (1:1,000, Mouse, Sigma, #T5168). After 3×10 min washes in TBST, membranes were incubated for 1 h at RT with HRP-conjugated secondary antibodies (1:5,000, Vector laboratories) diluted in TBST with 5% milk. Membranes were incubated with the Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad) and the signal was detected with a Fusion FX7 camera (ThermoFisher Scientific). Band intensity was quantified with Image J and normalized to actin or tubulin α . Each antibody was used on at least 2 different membranes.

MSD[®] ELISA tests

Triton X-100 soluble proteins were diluted in the diluent provided for the V-PLEX A β peptide panel kit (6E10 antibody, MSD[®], Rockville, MD). Samples were loaded in triplicate and manufacturer's protocol was followed. A β levels were quantified with the Discovery Workbench 4.0, MSD[®] software thanks to a standard curve, and normalized to the protein content in each well.

Cell sorting for RNAseq analysis

Mice were killed and their hippocampus rapidly collected in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Sigma). Cells were mechanically and enzymatically dissociated with fire-polished Pasteur pipettes and the neural tissue dissociation kit with papain (Miltenyi Biotec), following manufacturer's instructions. After filtration through a 50 μm -filter, cells were centrifuged 10 min at 300 g, and diluted in 500 μl of HBSS. Myelin removal beads II and MS columns (Miltenyi Biotec) were used to deplete myelin from cell suspensions, as described by the manufacturer's protocol. Cell sorting was performed on a BD Influx cell sorter, equipped with a 488 nm laser and a 530/40 detector. Non-fluorescent brain cells were used to set up the detector gain and position gates, which were kept constant throughout sorting. Cells were gated on a forward scatter/side scatter plot, then singlets were selected and finally cells were collected based on their GFP expression. Cells were centrifuged at 300 g for 5 min at RT, lysed in 400 μl TRIzol (Invitrogen) and stored at -80°C before RNA extraction. The two hippocampi of each mouse was processed and sorted independently. Typically, 6,000 to 20,000 GFP⁺ astrocytes

and 50,000 to 100,000 GFP⁺ cells were collected for each sample within 15–25 min.

Measure of A β uptake in vivo by flow cytometry

Three hours before sacrifice, mice received an *i.p.* injection of 10 mg/kg MXO4 (diluted at 2.5 mg/ml in 50% DMSO in saline, pH = 12) to label amyloid material and monitor its uptake in cells [39]. Mice were perfused for 4 min with cold dPBS. Their hippocampus was rapidly collected in HBSS. Cells were dissociated and myelin was depleted as describe above. Cells were centrifuged at 300 g for 5 min at 4 °C and resuspended in Fc block (1: 100, TruStain FcX™, anti-mouse CD16/32, Biolegend, San Diego, CA) in HBSS for 10 min on ice. Samples were centrifuged at 300 g for 5 min at 4 °C and resuspended in cell staining buffer (Biolegend) with anti-CD11b-PE (1: 100, eBioscience, San Diego, CA) and anti-CD45-PE-Cy5 (1: 300, eBioscience) for 30 min on ice, under mild agitation. Cells were centrifuged at 300 g for 5 min at 4 °C and resuspended in 400 μ l HBSS. Cell sorting was performed on a BD Influx cell sorter. MXO4 was detected at 450/30 nm (408 nm excitation), GFP at 530/40 nm (488 nm excitation), CD11b-PE and CD45-PECy5 at 594/26 nm and 670/30 nm, respectively (561 nm excitation). MXO4⁺ and MXO4[−] microglial cells were sorted separately and analyzed by RT-qPCR. Control samples of unlabeled or mono-fluorescent brain cells were used to set up detector gains and position sort gates, which were kept constant for all sorted samples. No compensation was required to accurately quantify MXO4, GFP, CD11b-PE and CD45-PECy5 signals within the same sample.

RNA extraction

Sorted cells were placed 5 min at RT and chloroform was added to TRIzol for 3 min. Samples were centrifuged at 12,000 g for 15 min at RT. Aqueous phase was collected and 1 volume of 70% ethanol was added. Samples were transferred onto an RNeasyMin Elute spin column and RNA was purified according to manufacturer's instructions, with on-column DNase treatment (RNeasy micro kit, Qiagen, Hilden, Germany). RNA was eluted with 14 μ l of RNase-free deionized water and stored at − 80 °C until transcriptomic analysis.

RNAseq analysis

RNA quality and integrity were evaluated with an Agilent RNA 6000 Pico assay and the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies, Santa Clara, CA). As the number of sorted cells was limited, especially for GFP⁺ astrocytes, we quantified total RNA with Agilent RNA 6000 Pico assay and used 0.8 to 1 ng of total RNA per sample. Full length double strand cDNA libraries were constructed with the Smarter Ultra Low Input RNA kit

v4 (Takara-Clontech, Mountain View, CA) with 11 to 14 LD-PCR cycles. Purification was done with Ampure XP (Beckman Coulter Genomics, Brea, CA). The full length ds cDNA libraries were qualified with an Agilent High Sensitivity DNA kit and quantified with the Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen). All libraries were normalized to 750 pg in 5 μ l as starting material to Nextera XT sample preparation kit (Illumina Incorporated, San Diego, CA). Ligation products were amplified with 12 PCR cycles. Stringent purification was done (0.6X of AMPure XP) to remove small inserts that would be sequenced preferentially. mRNAseq libraries were qualified and quantified with Agilent High Sensitivity DNA kit and Qubit dsDNA HS Assay Kit respectively, before sequencing on a HiSeq 2000 Illumina platform (2 $\times$ 100 bp). Quality controls and data analysis was performed by GenoSplice technology® (www.genosplice.com). Sequencing data quality, read repartition and insert size estimation were performed with FastQC, Picard-Tools, Samtools and rseqc. Reads were mapped on the mm10 Mouse genome assembly with STARv2.4.0 [17]. Gene expression analysis was performed as described previously [57]. Briefly, for each gene present in the Mouse FAST DB v2016_1_full annotations, reads aligning on constitutive regions (i.e. that are not prone to alternative splicing) were counted. Normalization of read counts and differential gene expression were performed with DESeq2 [49] on R (v.3.2.5). Only genes expressed in at least one of the two compared experimental conditions were analyzed. Genes were considered as expressed if their rpkm value was greater than 97.5% of the background rpkm value measured in intergenic regions. Results were considered statistically significant for *p* values ≤ 0.05 and fold-changes ≥ 1.5 .

Three sets of analysis were performed: (1) 7 GFP⁺ astrocyte samples were compared to 3 GFP[−] cell samples from the WT-GFP group, to validate sorting efficiency; (2) 4 GFP⁺ astrocyte samples from APP-GFP mice were compared to 7 GFP⁺ astrocyte samples from WT-GFP mice to identify transcriptional changes in reactive astrocytes due to AD; and (3) 5 GFP⁺ astrocyte samples from APP-SOCS3 mice were compared to 4 GFP⁺ astrocyte samples from APP-GFP mice to identify astrocyte genes that are normalized by SOCS3 in AD mice. Hierarchical clustering between GFP⁺ and GFP[−] cell samples was generated with MeV software, using Euclidean distance and average agglomeration method. RNAseq datasets are deposited on GEO under reference GSE108520.

Gene ontology analysis

Analysis for enriched Gene ontology (GO) terms were performed with Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) Functional annotation Tool (v6.8) [28] by Genosplice Technology®. GO

terms and pathways were considered as enriched for fold enrichment ≥ 2.0 , uncorrected p value ≤ 0.05 and minimum number of regulated genes in pathway/term ≥ 2.0 .

Weighted correlation network analysis (WGCNA)

WGCNA was performed with WGCNA R package [40] by Genosplince Technology®. Genes expressed in at least 20% of samples (14 029) were used. Modules with at least 30 genes and a $kME > 0.7$ were defined, with split = 2. ANOVA was performed on the Eigengene calculated in each sample, as defined in [40] and the module with a $p < 0.05$ was further analyzed by STRING to identify functional networks of regulated genes (<https://string-db.org/>).

RT-qPCR

RT-qPCR were performed on sorted astrocytes or microglial cells. Reverse transcription was performed with the VILO™ kit according to the manufacturer's protocol (SuperScript® VILO™ cDNA synthesis kit; Life Technologies, Carlsbad, CA). Samples were diluted at 0.2 ng/μl in H₂O with 100 μg/ml BSA and mixed with 250 nM of primers and Platinum SYBR-Green® (Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG; Life Technologies) for qPCR. PCR efficiency was between 85 and 110% for each set of primers (sequences shown in Additional file 2: Table S1). Nuclease-free water and samples without reverse transcription were used as negative controls. Expression levels of transcripts of interest were normalized with the ΔCt method to the abundance of *Rpl13a* and *actin* for hippocampal astrocytes or *Eef1a1* and *Actin* for microglial cells.

Electrophysiological recordings

Transverse hippocampal slices were prepared as described previously [65], from 8 to 9 month-old WT-GFP, 3xTg-GFP and 3xTg-SOCS3 mice and from 4 to 6 month-old WT-GFP and WT-JAK2ca mice. Briefly, mice were anesthetized with 5% isoflurane and decapitated. The brain was rapidly removed and placed in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF) saturated with 95% O₂ and 5% CO₂, containing (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1.3 MgCl₂, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃ and 10 glucose (pH = 7.4; 305 mOsmol/kg). A block of tissue containing the hippocampus was prepared and 350 μm transversal hippocampal slices were cut on a vibratome (Leica). Slices were incubated 30 min at 32 °C and allowed to recover for at least 1 h at RT.

Slices were transferred to a recording immersion chamber and were perfused with ACSF (3 ml/min) at RT during the whole experiment. For the input/output experiment in WT and 3xTg mice, an incision between CA3 and CA1 regions was made in presence of 50 μM picrotoxin in the perfusion bath. CA3 and CA1 areas

were identified with differential interference contrast microscopy and the region of interest (GFP⁺) was visualized with the epifluorescent mode of the microscope (Olympus BX50, Tokyo, Japan). Extracellular field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were evoked by orthodromic stimulations (100 μs, 0.033 Hz) of Schaffer collaterals with a glass pipette filled with ACSF or a tungsten bipolar electrode placed in the *stratum radiatum*, more than 150 μm away from the recording electrode. Then, fEPSPs were recorded, in current clamp mode ($I = 0$), with a glass pipette filled with ACSF (2–3 MΩ) and placed in the GFP⁺ region, in the *stratum radiatum* of CA1 area. Data were acquired with a Multi-clamp 700B amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), digitized with a Digidata 1320A digitizer (Axon Instruments Inc., Sunnyvale, CA), recorded and analyzed off line with pClamp and Clampfit 10.3 respectively (Molecular Devices). Recordings were low-pass filtered at 2 kHz and digitized at 10 kHz.

A stable baseline was recorded for at least 20 min before starting the input/output experiment. The same amplitude of stimulation was applied three times (0.033 Hz), before being increased by 10 V. Paired-pulse stimulation experiments were performed with two pulses of stimulation induced at 50 or 100 ms interval. The paired pulse ratio was calculated as the slope of the second fEPSP over the slope of the first fEPSP. Long-term potentiation (LTP) was induced after 20 min of baseline recording, by applying a high-frequency stimulation (HFS) protocol (100 Hz train of stimuli for 1 s, repeated three times at 20 s interval).

At the end of the recording session, slices were post-fixed in 4% paraformaldehyde for 48 h and processed for GFAP immunostaining following the protocol described above except that GFAP-Cy3 antibody was incubated at 1:200 for 48 h.

Morris water maze

The water maze was a white circular pool (120 cm diameter, 60 cm high) filled with water and white soluble paint at 21 °C. The testing room contained numerous black extra maze cues and was illuminated with 400 Lux at the pool center. Mouse behavior (distance to the platform and swim speed) was monitored by a video camera, mounted on the ceiling above the pool center, and a computerized tracking system (Ethovision 11.5, Noldus IT, The Netherlands). All tests were performed between 8 am and 1 pm. Mice were handled daily for 2 min for 5 d preceding the training. First, their ability to see and shelter on an emerged platform (11 cm diameter) was assessed with four trials of 60 s in one day, with an inter-trial interval (ITI) of 30 min, each with a different platform location. A 10 cm high object was placed on the emerged platform. For the training phase, mice were

given three trials every day for 5 d, with an ITI of 30 min. The starting position differed for each trial but was identical for all animals, with mice placed in the water facing the wall of the pool. An invisible escape platform was placed in the middle of one of the quadrants (1 cm below the water surface) equidistant from the sidewalls and the middle of the pool. The platform location remained constant throughout training. Each trial lasted 60 s or until the animal located the platform. Animals that did not find the platform were guided to it and given a latency score of 60 s. All animals were left on the platform for 30 s and then taken back to their home cage before starting the next trial. 72 h after training, animals were given one 30 s probe trial during which the platform was removed from the pool. The probe trial started from a position opposite to the platform. The pool was divided into four quadrants of equal size. The percentage of time spent in each quadrant was recorded. No mouse was excluded from the analysis.

Statistics

Results are expressed as mean $\pm$ SEM. N are indicated for each group in the order presented on the histogram. No statistical method was used to predetermine sample size. Sample size was chosen based on prior experience for each experiment, to yield adequate power to detect specific effects. Statistical analysis were performed with Statistica software (StatSoft, Tulsa, OK) or GraphPad Prism 7 (La Jolla, CA). We used paired or unpaired two-tailed Student *t* test to compare two groups and repeated-measures or one-way ANOVA and Tukey's post hoc test to compare three groups. For each analysis, normality of residues and homoscedasticity were assessed, as well as sphericity for repeated-measures ANOVA. If any conditions of application was not fulfilled, we used non-parametric tests. Two groups were compared by the Mann-Whitney or Wilcoxon test and three independent groups were compared by a Kruskal-Wallis test followed by post-hoc comparison of mean ranks. Percentages were normalized by Arcsin transformation and analyzed with parametric tests. The significance level was set at $p < 0.05$. Investigators were partially blinded to the group when performing experiments and measuring outcomes (as the group can be guessed based on the presence of amyloid plaques or GFP levels for example).

Results

The JAK2-STAT3 pathway controls astrocyte reactivity in AD mice

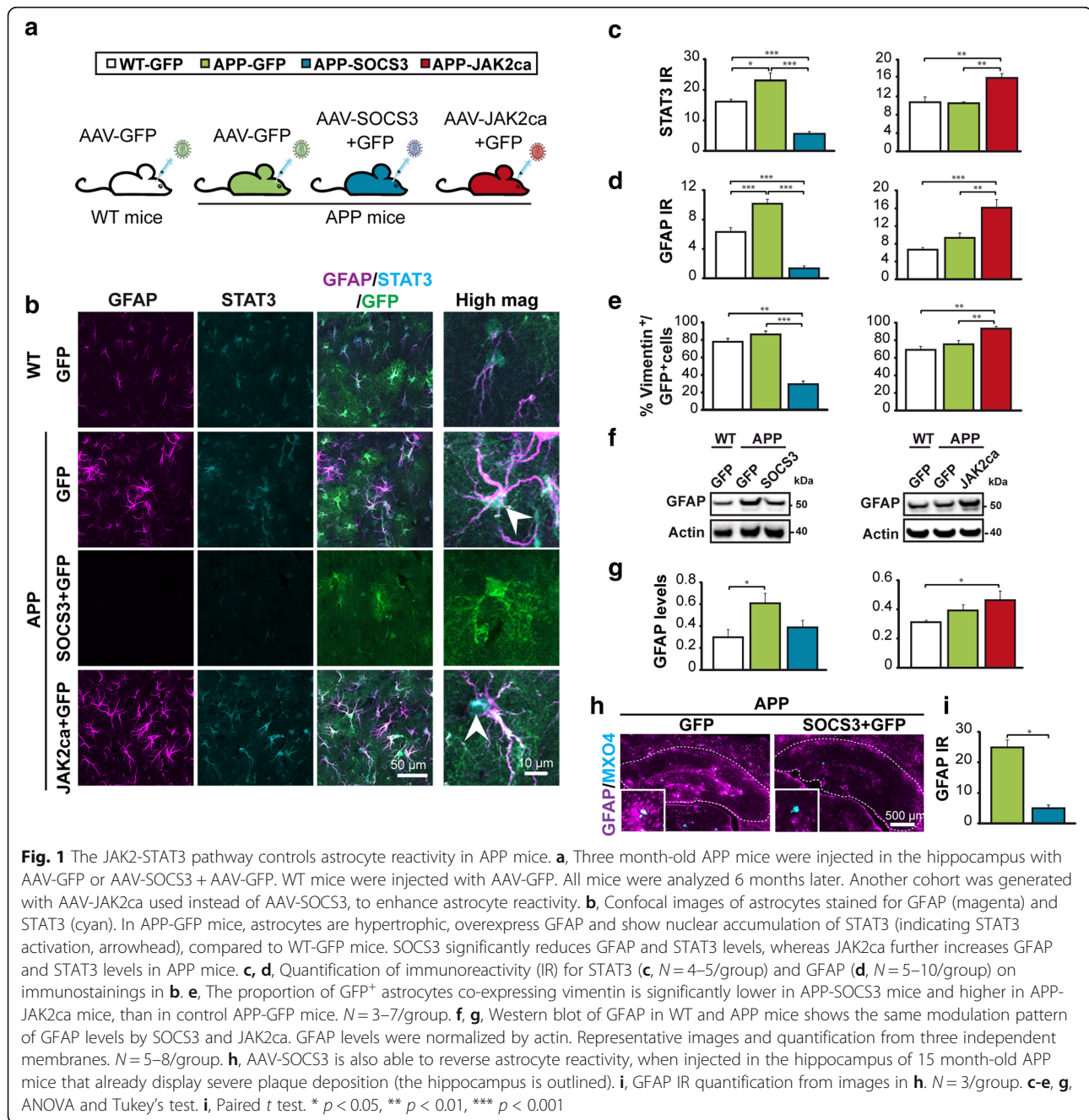
To study whether the JAK2-STAT3 pathway controls astrocyte reactivity in AD, we inhibited this pathway by overexpressing its endogenous inhibitor Suppressor Of Cytokine Signaling 3 (SOCS3, [6]) in APP/PS1dE9 mice

(hereafter called APP mice). We used adeno-associated vectors (AAV) that target astrocytes (Additional file 1: Figure S1) to express SOCS3 or GFP in hippocampal astrocytes. APP mice display progressive astrocyte reactivity in the hippocampus, where amyloid plaques accumulate [8, 30]. They were injected with AAVs in the CA1 region of the hippocampus, before detectable amyloid plaque deposition. AAV-SOCS3 was co-injected with AAV-GFP to visualize infected astrocytes (APP-SOCS3 mice). Control mice included APP and WT littermates injected with AAV-GFP alone, at the same total viral titer (Fig. 1a). Approximately 25% of the hippocampus was targeted by these AAV, as quantified with GFP staining, and more than 97% of GFAP⁺ astrocytes were GFP⁺ within the infected volume (data not shown). By immunostaining, we found that nuclear STAT3 levels in hippocampal astrocytes were higher in 9 month-old APP mice than in WT-GFP mice, indicating STAT3 activation. STAT3 immunoreactivity was efficiently reduced by SOCS3 in APP mice at 9 months (Fig. 1b, c) and even more so at 12 months (Additional file 3: Figure S2). Of the seven members of the STAT family, astrocytes express STAT3 at highest levels ([75] and our own RNAseq data). However, STAT1 was proposed to play important roles in brain inflammatory processes [71]. Here, we found that STAT1 expression was not induced in APP mice, confirming that STAT3 is the major STAT effector in astrocytes (Additional file 3: Figure S2). Likewise, extracellular signal-regulated kinase (ERK), a kinase that could also be inhibited by SOCS3 [36] was not activated in APP astrocytes and not further modulated by SOCS3 (Additional file 3: Figure S2).

Compared to WT, APP astrocytes were hypertrophic and overexpressed GFAP, the two classical hallmarks of reactive astrocytes (Fig. 1b, d). SOCS3 prevented GFAP upregulation in the hippocampus of APP mice, as shown by immunostaining (Fig. 1b, d) and western blotting on hippocampal samples from WT-GFP, APP-GFP and APP-SOCS3 mice (Fig. 1f, g). SOCS3 also reduced the number of vimentin⁺ astrocytes, another intermediate filament upregulated in reactive astrocytes (Fig. 1e).

Interestingly, over-activation of STAT3 by expression of a constitutively active mutant of the upstream kinase JAK2 (JAK2ca [23]) was able to further increase astrocyte reactivity in APP mice. By contrast to APP-GFP mice, APP-JAK2ca mice displayed enhanced STAT3 nuclear accumulation in astrocytes (Fig. 1b, c) and increased GFAP and vimentin protein levels (Fig. 1b-g).

Importantly, SOCS3 was also efficient in aged APP mice that already display strong astrocyte reactivity. Injection of AAV-SOCS3 in the hippocampus of 15 month-old APP mice reversed established astrocyte reactivity, as seen by a significant decrease in GFAP levels (Fig. 1h, i). These results show that the JAK2-STAT3 pathway is necessary for



the induction and long-term maintenance of the basic morphological features of reactive astrocytes in APP mice.

SOCS3 normalizes multiple reactive astrocyte markers in AD mice

Besides morphological alterations, astrocyte reactivity is characterized by significant gene expression changes, especially during AD [48, 62, 85]. We thus studied the effects of SOCS3 on the transcriptional profile of APP astrocytes. We performed RNA sequencing (RNAseq) of

GFP⁺ astrocytes acutely isolated by FACS from WT-GFP, APP-GFP and APP-SOCS3 hippocampi (Fig. 2a). GFP⁺ cells comprising microglia, neurons, oligodendrocyte precursor cells and non-infected astrocytes were collected together. Genome-wide RNAseq analysis of GFP⁺ astrocytes and other GFP⁺ cells from WT-GFP mice identified 6949 genes differentially-expressed (Fold change > 1.5 and $p < 0.05$, Fig. 2b). Expression of cell-type specific markers validated the purity of sorted GFP⁺ astrocytes (Additional file 4: Figure S3).

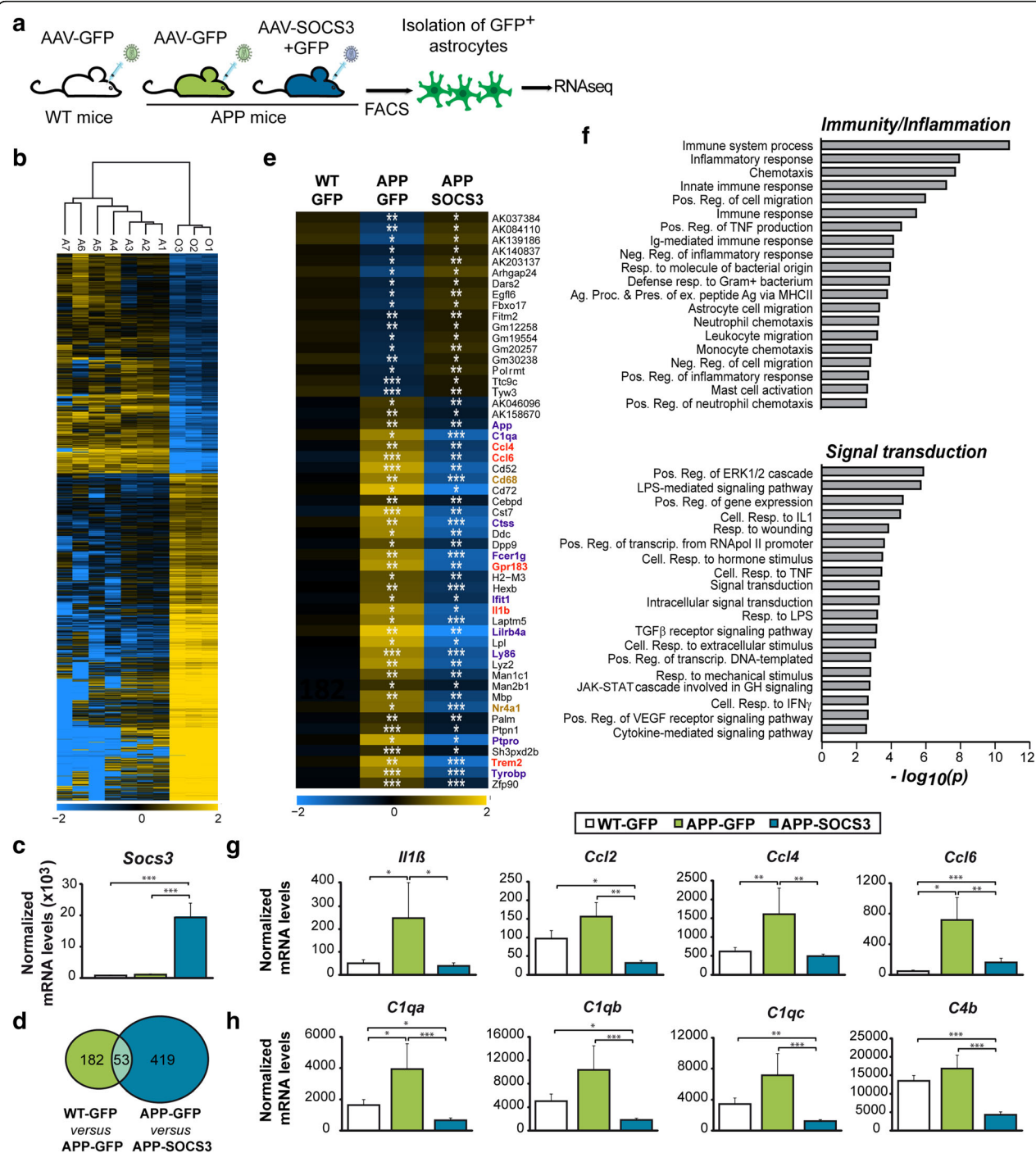


Fig. 2 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 2 SOCS3 restores the transcriptional profile of APP astrocytes. **a**, Hippocampal astrocytes of 9 month-old WT-GFP ($N = 7$), APP-GFP ($N = 4$) or APP-SOCS3 ($N = 5$) mice were isolated by FACS and their transcriptome examined by RNAseq analysis. **b**, Hierarchical clustering of the ~ 7000 differentially expressed genes between GFP⁺ astrocytes (samples A1-A7) and all other GFP⁻ cells (samples O1-O3), which comprise microglial cells, neurons, oligodendrocyte precursor cells and non-infected astrocytes. **c**, *Socs3* mRNA levels are increased more than 10 times in APP-SOCS3 astrocytes compared to WT-GFP and APP-GFP astrocytes. **d**, Venn Diagram showing the number of differentially expressed genes between WT-GFP and APP-GFP astrocytes and APP-GFP and APP-SOCS3 astrocytes. **e**, Expression levels for the 53 genes dysregulated in APP-GFP astrocytes and normalized in APP-SOCS3. Color scale represents mean-centered expression (log2-transformed). Genes belonging to immunity/inflammation pathways are in purple, those belonging to signal transduction are in brown. Genes common to the two pathways are in red. **f**, Pathway analysis on the 472 genes regulated by SOCS3 in APP astrocytes reveals a specific enrichment in GO terms linked to immunity/ inflammation and signal transduction. Ag. Proc & Pres. = antigen processing and presentation. Cell. = cellular. Ex. = exogenous. Neg. = negative. Pos. = positive. Reg. = regulation. Resp. = response. **g, h**, SOCS3 normalizes gene expression of cytokines/chemokines (**g**) and complement factors (**h**), which are induced in APP-GFP astrocytes. Wald test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

After validation of sorting efficiency, we then compared the transcriptome of GFP⁺ astrocytes between the three groups. *Socs3* mRNA levels were 12 to 16 times higher in astrocytes of the APP-SOCS3 group than in the APP-GFP and WT-GFP groups respectively (Fig. 2c). We found hundreds of genes differentially expressed between APP-GFP and WT-GFP astrocytes groups and between APP-SOCS3 and APP-GFP astrocytes (Fig. 2d). A majority of genes (85%) were down-regulated by SOCS3, consistent with its inhibitory action on STAT3-mediated transcription. Several genes previously described as up-regulated in astrocytes acutely isolated from 15 month-old APP mice [62], were already induced at 9 months in APP-GFP compared to WT-GFP astrocytes (e.g. *Cst7*, *Ccl4*, *Ccl6*, *Ctss*, *Trem2*, *Tyrbp*, *Il1b*). Gene Ontology (GO) analysis with DAVID showed an enrichment in biological processes related to inflammation/immunity (data not shown), as reported in 15 month-old APP mice [62], as well as in laser captured cortical astrocytes from AD patients [73]. Fifty-three genes were either down- or up-regulated in APP-GFP mice relatively to WT-GFP mice and restored by SOCS3 (Fig. 2d, e). This list was also significantly enriched in GO biological processes linked to inflammation/immunity and signal transduction ($p < 0.05$, Fig. 2e). In the list of 472 genes regulated by SOCS3 in APP mice, there was an even larger number of enriched GO terms linked to these biological processes ($p < 3.10^{-3}$, Fig. 2f). For example, SOCS3 abrogated the induction of the cytokines and chemokines *Il1 β* , *Ccl2*, *Ccl4* and *Ccl6* observed in APP-GFP astrocytes (Fig. 2g). Interestingly, several complement factors (*C1qa*, *C1qb*, *C4b*, *C1qc*), were down-regulated by SOCS3 in APP astrocytes (Fig. 2h).

We then studied SOCS3 effects on reactive astrocyte genes, as described in previous transcriptional studies [14, 48]. Strikingly, SOCS3 reduced the expression of genes from all three categories of reactive markers (pan, A1 and A2) that were induced in APP astrocytes (Fig. 3a). Few genes were not down-regulated by SOCS3, suggesting that even if SOCS3-expressing astrocytes show a significant down-regulation of reactive genes, they may

still not be fully comparable to normal astrocytes from WT mice. Last, to gain insight into the transcriptional networks regulated by SOCS3 in APP astrocytes, we performed a weighted gene correlation network analysis (WGCNA). This statistical method identifies modules of co-regulated genes across samples. One module among 19 was identified as differentially expressed between the three groups ($p = 0.018$, Fig. 3b). This module was comprised of 567 genes mainly down-regulated by SOCS3 (Fig. 3c). Interestingly, this module contained several pan (*Gfap*, *Vimentin*), A1 (*Serping1*, *H2-D1*, *Srgn*) and A2 (*Tm4sf1*, *CD14*) genes (Additional file 5: Table S2), emphasizing that markers of these two extreme classes are co-regulated by SOCS3. This module also contained genes related to inflammation (e.g. *C1qa*, *C1qb*, *C1qc*, *Ccl3*, Additional file 5: Table S2, Additional file 6: Figure S4). We performed an interaction network analysis with STRING on the 100 most connected genes of the module. Gene networks linked to complement system/inflammation were identified, as well as cytoskeleton and cell adhesion, which may underlie the morphological changes characteristic of reactive astrocytes (Additional file 6: Figure S4).

Overall, these results show that SOCS3 operates as a master inhibitor on transcriptional programs of reactivity, regulating different neuroinflammatory markers in reactive astrocytes.

JAK2-STAT3-mediated astrocyte reactivity promotes amyloid deposition in APP mice

The identification of a master regulator of reactive astrocytes makes it possible to evaluate their overall contribution to AD pathological outcomes. We first investigated the impact of JAK2-STAT3-mediated astrocyte reactivity on amyloid deposition, a major histopathological hallmark of AD [24]. SOCS3-mediated inhibition of astrocyte reactivity significantly reduced the number of BAM10⁺ amyloid plaques in the hippocampus of 9 month-old APP mice (Fig. 4a, b). This effect was also observed after labeling plaques with methoxy-XO4 (MXO4), a fluorescent Congo red-derivative that binds

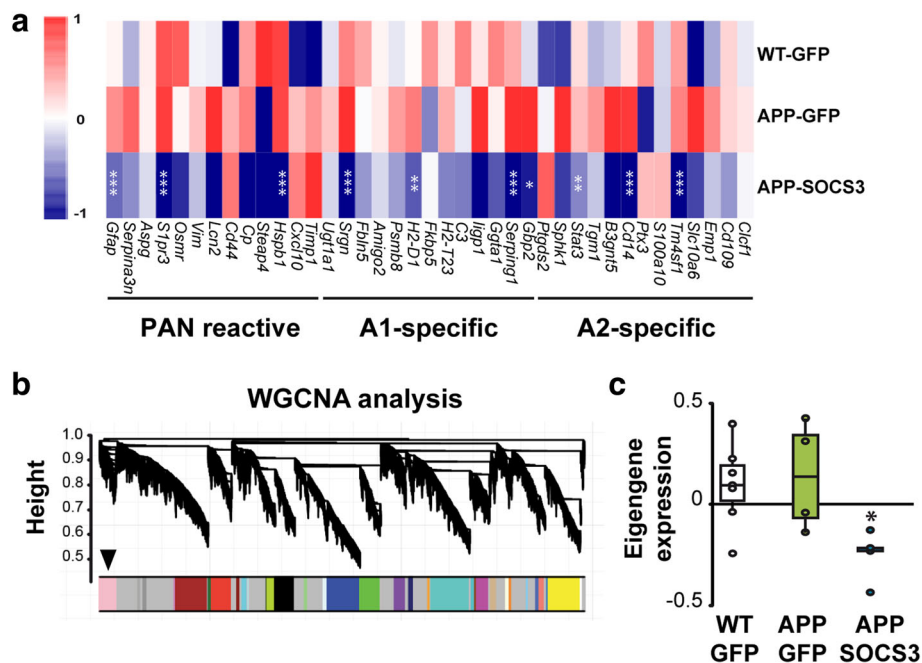


Fig. 3 SOCS3 inhibits the expression of reactive astrocyte markers. **a**, Heatmaps of genes belonging to the pan, A1 or A2 reactive astrocyte cassettes. SOCS3 decreases the expression of markers belonging to all categories, in APP astrocytes. Color scales represent mean-centered expression (log2-transformed). Wald test. **b**, Dendrogram obtained by WGCNA with the significant module indicated with an arrow. **c**, The significant WGCNA module is mainly formed by genes down-regulated by SOCS3. ANOVA. $N = 7-4-5$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

aggregated amyloid (-36% , $p < 0.05$, Student t test, data not shown). Importantly, over-activation of astrocytes with JAK2ca had opposite effects (Fig. 4a, b). The average size of individual plaques was identical between groups, suggesting that only the number, not the properties of plaques was impacted by SOCS3 (Fig. 4c). Levels of soluble human amyloid β ($A\beta$)42 and $A\beta$ 40 peptides, and their ratio were not significantly different between APP-GFP, APP-SOCS3 or APP-JAK2ca mice (Fig. 4d). Moreover, changes in amyloid plaque load were not due to changes in the expression of proteins involved in amyloid precursor protein (APP) metabolism. Indeed, protein levels of APP itself, of the pro-amyloidogenic β -secretase BACE1, or of insulin degrading enzyme (IDE) and apolipoprotein E (ApoE), two proteins released by astrocytes and involved in $A\beta$ elimination, were not impacted by SOCS3 or JAK2ca (Additional file 7: Figure S5).

We then focused on SOCS3, as its plaque lowering effects were more therapeutically relevant. Because microglia play a key role in amyloid plaque elimination via phagocytosis [42], we investigated whether inhibition of astrocyte reactivity increases microglia phagocytic activity, which could explain decreased amyloid load in APP-SOCS3 mice. The number of IBA1⁺ microglial cells in contact with MXO4⁺ amyloid plaques was not different between APP-SOCS3 and APP-GFP mice (Fig. 4e, f).

MXO4 also labelled intracellular amyloid material in IBA1⁺ microglial cells on brain sections. In fact, more than 95% of microglia cells in contact with plaques were MXO4⁺, revealing active microglial phagocytosis of amyloid plaques (Fig. 4g, h). MXO4⁺ material was either localized at the membrane or within the soma (Fig. 4g), but the relative localization of MXO4⁺ within microglia was not different between APP-SOCS3 and APP-GFP mice (Fig. 4h). To have dynamic quantification of microglia (and astrocyte) phagocytic capacity, MXO4 was injected *i.p.* 3 h before mouse sacrifice and its accumulation within dissociated brain cells was monitored by FACS. Astrocytes were identified by their GFP expression, while microglial cells were labelled with CD11b and CD45 antibodies (Fig. 4i). The percentages of GFP⁺ astrocytes (4%) and total microglial cells (14%) were not different between WT-GFP, APP-GFP and APP-SOCS3 mice (data not shown). No MXO4 uptake was detected in WT cells (Fig. 4j). Strikingly, we found no evidence for active MXO4 uptake in GFP⁺ astrocytes (Fig. 4j). In addition, the expression of several receptors or proteins involved in phagocytosis (*Abca1*, *ApoE*, *Axl*, *Gulp1*, *Itgav*, *Itgb5*, *Ldlr*, *Lrp1*, *Megf10*, *Mertk*, [10, 55]) were expressed at similar levels in astrocytes of the three groups or only down-regulated by SOCS3 (*Fcgr1g*, *Fcgr2b* and *Fcgr3*, Additional file 8: Table S3), further suggesting that astrocyte phagocytosis is not involved in

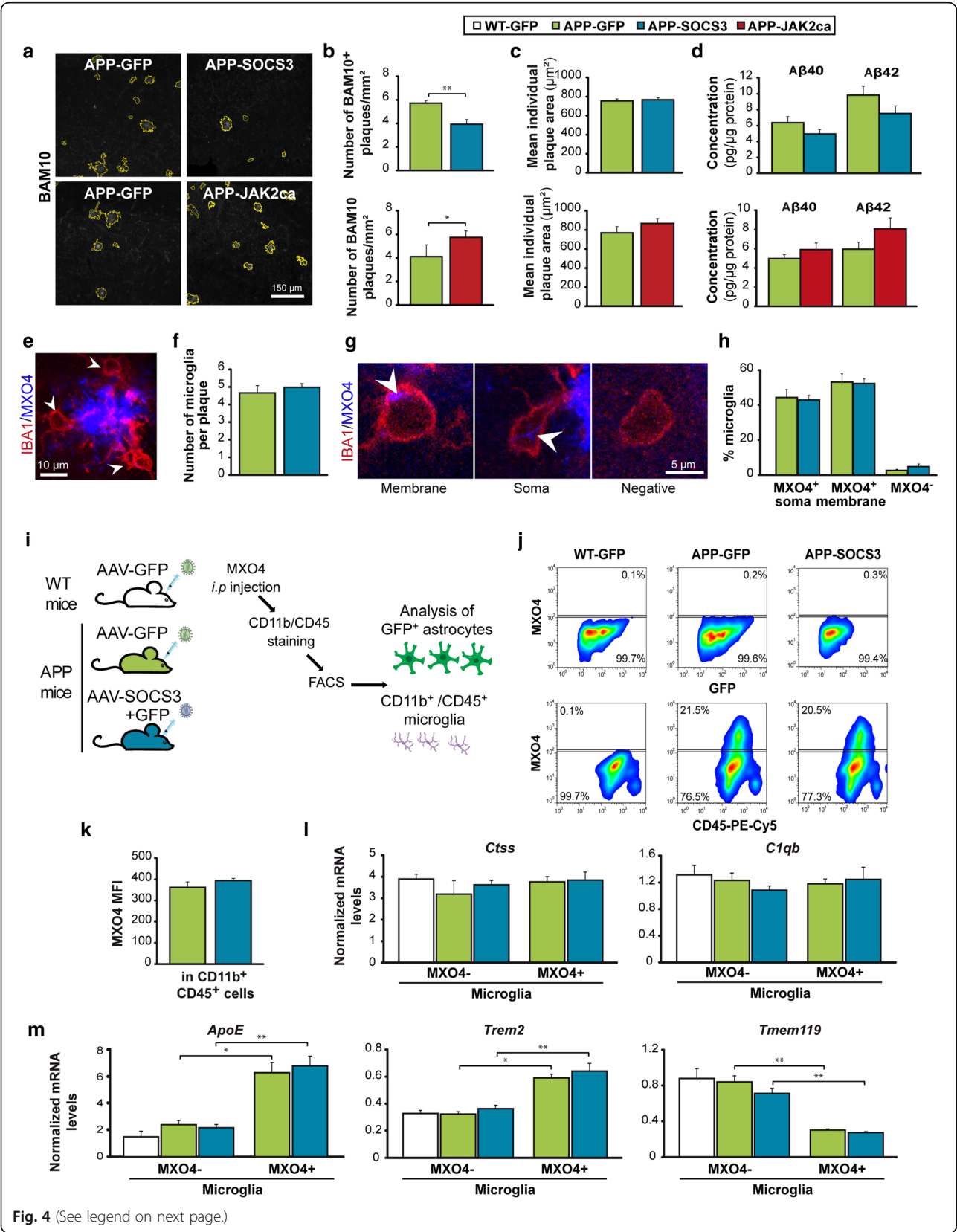


Fig. 4 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 4 Inhibition of JAK2-STAT3-mediated astrocyte reactivity reduces amyloid load in APP mice without impacting microglial cells **a**, Representative images of BAM10⁺ amyloid plaques (white) automatically delineated in yellow in APP-GFP, APP-SOCS3 and APP-JAK2ca mice. **b**, The number of hippocampal BAM10⁺ plaques is significantly decreased by SOCS3 ($N=9-8$) and increased by JAK2ca in APP mice ($N=6-6$). SOCS3 and JAK2ca effects were measured in two independent cohorts. **c**, The average size of individual BAM10⁺ amyloid plaque is similar between groups. **d**, Dosage of A β 40 and A β 42 peptide concentrations in Triton-X100-soluble protein homogenates from the hippocampus of APP-GFP ($N=10$ or 6), APP-SOCS3 ($N=8$) and APP-JAK2ca mice ($N=6$). A β 40 and 42 levels are not significantly different between groups. **e**, IBA1⁺ microglial cells (red, arrowheads) in contact with a MXO4⁺ amyloid plaque (blue). **f**, The number of microglia per plaque is similar between APP-GFP and APP-SOCS3 mice. $N=10-8$. **g**, Confocal images of MXO4⁺ material (blue) in IBA1⁺ microglial cells (red). Microglial cells in contact with plaques either display MXO4 staining (white arrowhead) at the membrane, in the cytosol or are MXO4⁻. **h**, The proportion of these three classes of microglial cells is not different between groups. $N=10-8$. **i**, Experimental design to monitor A β phagocytosis. WT-GFP ($N=10$), APP-GFP ($N=6$) and APP-SOCS3 ($N=8$) mice were injected with MXO4, 3 h before sacrifice. After staining, hippocampal CD11b⁺/CD45⁺ microglia and GFP⁺ astrocytes were analyzed by FACS. **j**, Representative gates to analyze MXO4⁺ amyloid uptake in astrocytes and microglia. There are 20% MXO4⁺ microglial cells in both APP-GFP and APP-SOCS3 groups and no MXO4⁺ astrocytes. **k**, No difference in the MXO4 median fluorescent intensity (MFI) is observed between APP-GFP and APP-SOCS3 microglial cells. **l-m**, RT-qPCR analysis on microglial cells acutely isolated from the hippocampus of 12 month-old WT-GFP, APP-GFP and APP-SOCS3 mice. **l**, mRNA levels of *Ctss* and *C1qb*, two microglial homeostatic genes, is similar in all groups. **m**, *ApoE* and *Trem2* mRNA levels are higher in phagocytic MXO4⁺ microglia than non-phagocytic MXO4⁻ microglia, while *Tmem119* levels are lower in MXO4⁺ microglia. This transcriptional profile is reminiscent of DAM microglia [34]. Astrocyte de-activation by SOCS3 does not impact the transcriptional profile of either type of microglia. $N=3-8$ /group. **b, d, h**, Student t test. **c, f, k**, Kruskal-Wallis test. **l, m**, One way ANOVA to compare the 3 groups within MXO4⁻ cells and Student t test to compare two groups within MXO4⁺ cells. Mann-Whitney test to compare MXO4⁺ and MXO4⁻ microglial cells within APP-GFP or APP-SOCS3 groups. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

reduced amyloid deposition with SOCS3. In contrast to astrocytes, ~20% of CD11b⁺/CD45⁺ microglial cells accumulated MXO4⁺ material in both APP-GFP and APP-SOCS3 mice (Fig. 4j). MXO4 median fluorescent intensity in microglia was not different between these two groups (Fig. 4k). A sub-class of microglia with active phagocytic capacities was recently described as « disease-associated microglia » DAM, [34]. It is possible that inhibition of astrocyte reactivity with SOCS3 only impacts a specific class of microglial cells like DAM. To explore this possibility, expression of genes specific for homeostatic microglia (*Ctss* and *C1qb*) and DAM cells were analyzed in MXO4⁻ and MXO4⁺ microglial cells. MXO4⁺ microglia had a gene profile characteristic of DAM (up-regulation of *ApoE* and *Trem2*; downregulation of *Tmem119*), consistent with the strong phagocytic activity of these cells. SOCS3 expression in astrocytes did not change the levels of homeostatic microglia or DAM-specific markers (Fig. 4l, m).

Overall, we show that SOCS3 does not significantly impact microglial molecular profile or phagocytic capacity. The reduction in amyloid deposition with SOCS3 is not due to enhanced phagocytosis by glial cells.

Inhibition of astrocyte reactivity improves spatial learning in APP mice

We next tested whether SOCS3-mediated inhibition of astrocyte reactivity improved behavioral defects in APP mice. Nine month-old WT-GFP, APP-GFP and APP-SOCS3 mice were tested on the Morris water maze to assess spatial learning and memory. Swim speed was not different between groups ($p=0.63$ for group effect,

repeated-measure ANOVA). As previously described [16], APP-GFP mice displayed delayed task learning, as they only improved their ability to find the hidden platform by training day 4, while WT-GFP mice achieved this performance by day 2 (Fig. 5a, repeated-measures ANOVA $p=0.0136$ for group effect, $p<10^{-6}$ for day effect). By contrast, APP-SOCS3 mice learnt the task as quickly as WT-GFP mice, showing that SOCS3 corrects learning deficits in APP mice. Mice were probed for spatial memory 72 h after the last day of training. WT-GFP mice displayed the expected preference for the target quadrant, while APP-GFP mice explored all quadrants similarly (Fig. 5b). SOCS3 did not improve spatial memory in APP mice (Fig. 5b), showing that inhibition of hippocampal astrocyte reactivity by SOCS3 improves spatial learning but not memory retrieval in APP mice.

SOCS3 restores synaptic transmission and plasticity in 3xTg mice

Given that astrocyte reactivity inhibition restores a complex behavioral task, we then examined the underlying cellular mechanisms in acute hippocampal slices. We studied synaptic transmission and plasticity, which are altered in AD [74] and regulated by astrocytes [5]. For this study, we used 3xTg-AD mice (thereafter called 3xTg mice) that display more robust synaptic deficits than APP mice [50]. 3xTg mice show early impairment in synaptic transmission and long-term plasticity before amyloid and Tau pathology [59]. 3xTg mice were injected at 3–4 months with AAV-GFP or AAV-SOCS3 + AAV-GFP (3xTg-GFP and 3xTg-SOCS3 mice respectively) and studied 5 months later, when they display synaptic deficits and higher GFAP levels [11, 53] but before

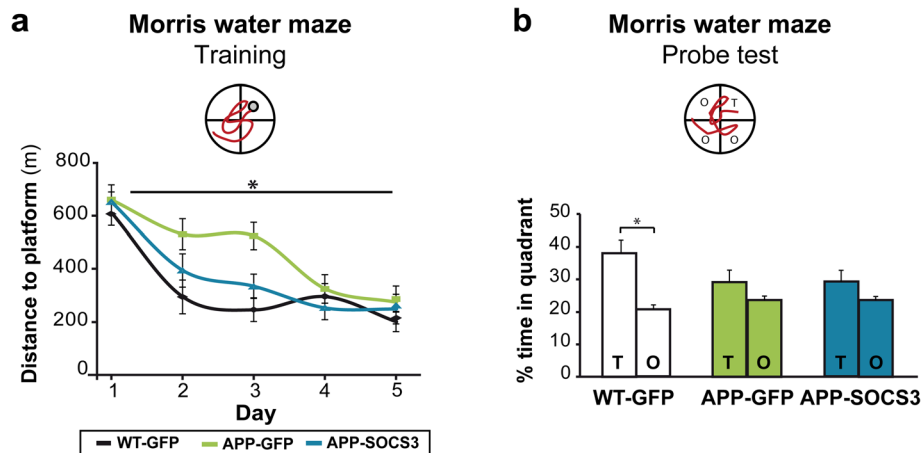


Fig. 5 Inhibition of STAT3-mediated astrocyte reactivity improves spatial learning in APP mice **a**, Training phase of the Morris water maze. APP-GFP mice ($N=12$) need more trials to learn the task than WT-GFP mice ($N=11$). This learning deficit is corrected by SOCS3 expression in APP astrocytes ($N=11$). Repeated-measures ANOVA. **b**, Probe phase of the Morris Water maze, 72 h after the last training session. Unlike WT-GFP mice, APP-GFP mice do not display preference for the target quadrant (T) over other quadrants (O). This memory deficit is not corrected by SOCS3. Wilcoxon test. * $p < 0.05$

amyloid plaque and Tau deposition ([59], Fig. 6a). Like in APP mice, SOCS3 was able to block astrocyte reactivity in the hippocampus of 3xTg mice, as seen by significantly lower GFAP levels in 3xTg-SOCS3 mice than in 3xTg-GFP mice (Fig. 6b). We then studied basal glutamatergic synaptic transmission, short-term and long-term synaptic plasticity in acute hippocampal slices prepared from the three groups. Field excitatory post-synaptic potentials (fEPSPs) were recorded in the infected, GFP⁺ region of the *stratum radiatum* in the CA1 area (Fig. 6a). As reported previously in 3xTg-GFP mice [59], the input-output relationship for evoked fEPSPs at CA3-CA1 synapses was shifted to the right, indicating impaired basal glutamatergic synaptic transmission (Fig. 6c). This was probably not due to a modification of glutamate release probability because the paired-pulse ratio was unchanged (Fig. 6c, d). Interestingly, inhibition of astrocyte reactivity by SOCS3 rescued the input-output relationship (Fig. 6c). As reported before [59], LTP induced by high frequency stimulation (HFS) of Schaffer collaterals was impaired in 3xTg-GFP mice, in comparison to WT-GFP mice that displayed a 50% increase in fEPSPs after HFS (Fig. 6e, f). Strikingly, SOCS3 fully restored LTP deficits in 3xTg mice (Fig. 6e, f), suggesting that astrocyte reactivity plays a major role in AD-related synaptic alterations, and that these alterations can be reversed.

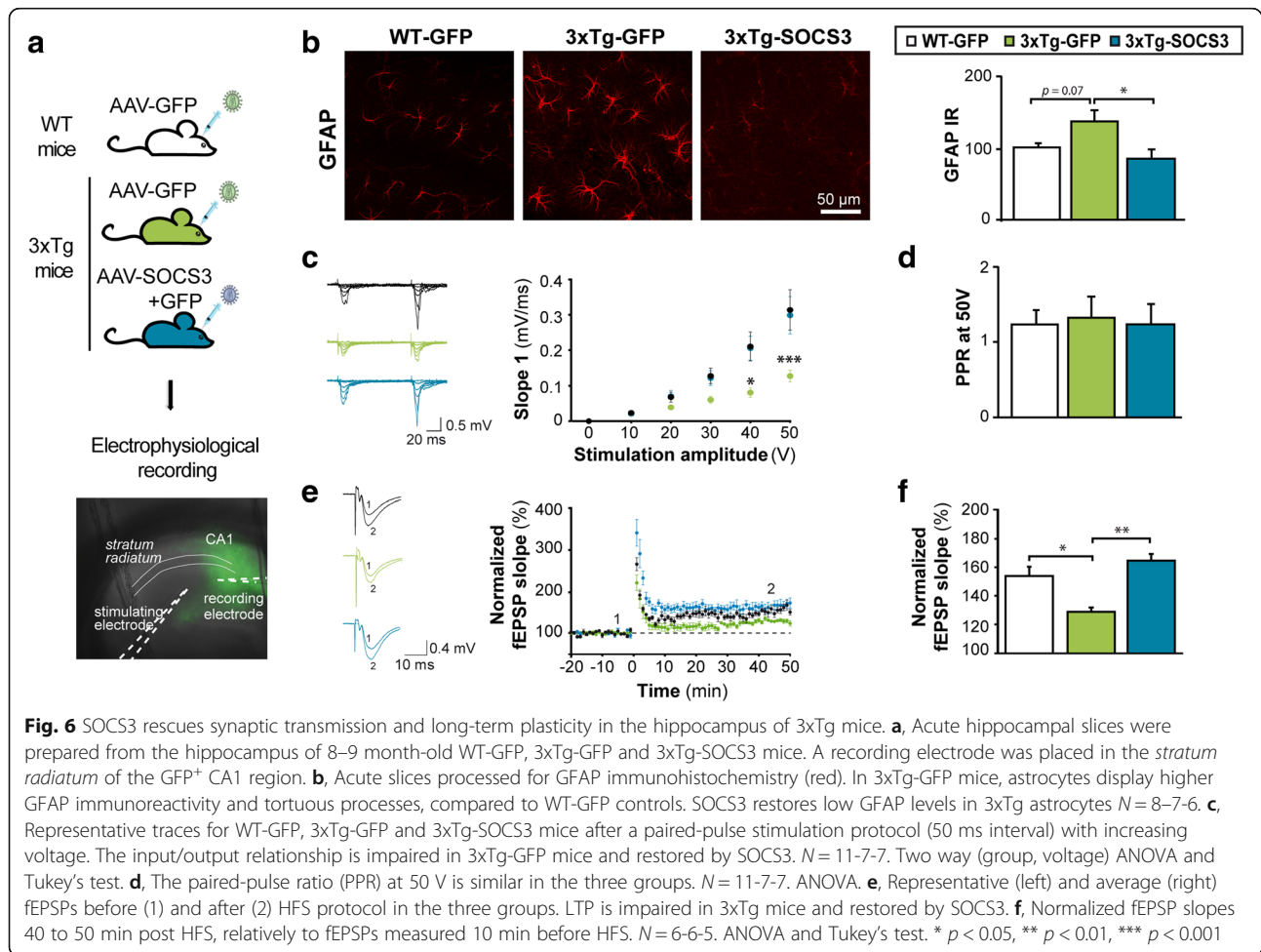
JAK2-STAT3 pathway activation in astrocytes induces reactivity and synaptic alterations

We reasoned that if synaptic deficits in 3xTg mice are due to JAK2-STAT3 pathway activation in astrocytes, its

stimulation in naïve WT mice should result in comparable synaptic deficits.

To this end, we first studied whether activation of the JAK2-STAT3 pathway by JAK2ca was sufficient to induce astrocyte reactivity in the hippocampus of WT mice (Fig. 7a). As expected, we found that JAK2ca significantly increased STAT3 immunoreactivity in hippocampal astrocytes (Fig. 7b, c). Importantly, immunoreactivity for GFAP was increased in a large part of the hippocampus of WT-JAK2ca mice (Fig. 7d-f). JAK2ca-astrocytes also over-expressed vimentin (Fig. 7e) and had enlarged soma with tortuous processes (Fig. 7e, g). RT-qPCR analysis on acutely isolated astrocytes from WT-JAK2ca or WT-GFP mice confirmed that JAK2ca significantly increased mRNA levels of reactive genes (*Gfap*, *serpina3n*) in astrocytes (Fig. 7h). Overall, activation of the JAK2-STAT3 pathway in astrocytes was sufficient to induce morphological and molecular hallmarks of reactivity in the complete absence of pathological environment.

We then recorded synaptic activity in the infected GFP⁺ hippocampal CA1 region of WT-GFP and WT-JAK2ca mice (Fig. 8a). JAK2ca-mediated astrocyte reactivity impaired basal glutamatergic synaptic transmission (Fig. 8b) but it did not impact the paired-pulse ratio (Fig. 8c). Strikingly, HFS protocol failed to induce LTP in JAK2ca mice, as in 3xTg mice, while it induced a 60% increase in fEPSP in WT-GFP mice (Fig. 8d, e), showing that JAK2ca causes significant deficits in long-term synaptic plasticity. Taken together, our results show that JAK2-STAT3-mediated astrocyte reactivity induces synaptic dysfunction in the hippocampus, and is a potent target for synaptic restoration in AD.



Discussion

In this study, we combined astrocyte-targeted viral gene transfer, histology, biochemical analysis, cell sorting, astrocyte-specific transcriptomics, behavioral analysis and electrophysiology, in mouse models of AD and naïve WT mice. We used two transgenic mouse models of AD that recapitulate amyloid deposition, synaptic and behavioral alterations characteristic of AD, as well as progressive astrocyte reactivity including morphological and molecular changes. We found that inhibition of the JAK2-STAT3 pathway normalizes several features of astrocyte reactivity and improves three key pathological hallmarks in AD mouse models, showing that reactive astrocytes have deleterious effects in AD (Fig. 9).

The JAK2-STAT3 pathway controls astrocyte reactivity

We previously reported that STAT3 is activated in reactive astrocytes in several mouse and primate models of ND [8], and the active, phosphorylated form of STAT3 is found in some hippocampal GFAP⁺ astrocytes in AD patients [81]. STAT3 is also activated in

reactive astrocytes in acute CNS diseases such as ischemia, or spinal cord injury [12, 61]. Many molecular triggers are able to activate STAT3 (e.g. cytokines, growth factors, as well as ephrins [80] or the Notch pathway [41]). Therefore, despite the variety of pathological stimuli associated with these disorders, they appear to converge, either directly or indirectly, on STAT3, making STAT3 activation a universal feature of astrocyte reactivity.

We used viral gene transfer in the mouse brain to inhibit or activate the JAK2-STAT3 pathway in astrocytes and identified this cascade as a master regulator of astrocyte reactivity. We show that overexpression of a constitutively active form of JAK2 in WT astrocytes is sufficient to trigger robust astrocyte reactivity in the hippocampus, in the absence of pathological stimulus. By expressing the inhibitor SOCS3 in astrocytes, we also showed that the JAK2-STAT3 pathway controls astrocyte reactivity in two mouse models of AD. Interestingly, SOCS3 was not only able to prevent, but also to reverse astrocyte reactivity in the hippocampus of aged APP mice. Thus, activation of

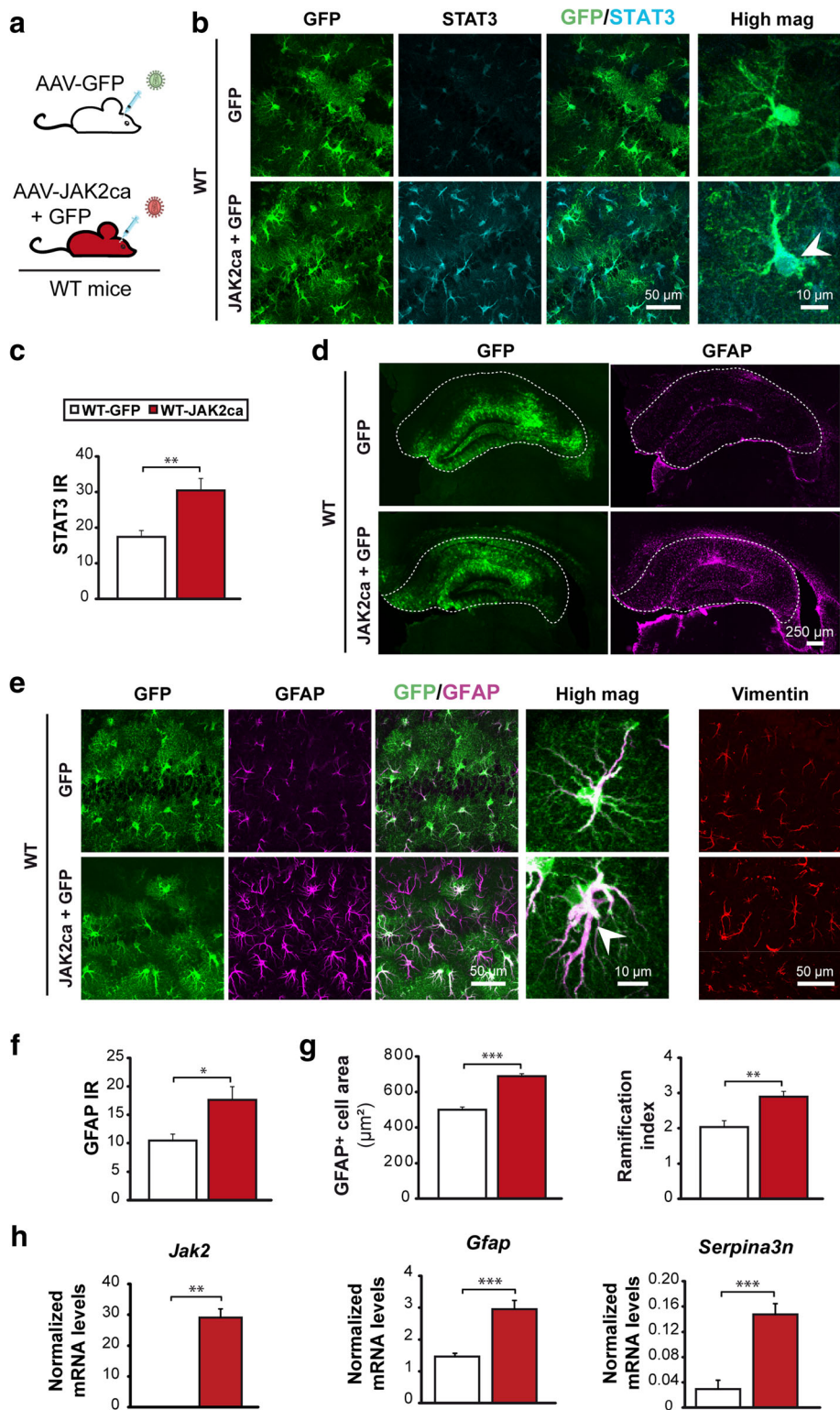


Fig. 7 (See legend on next page.)

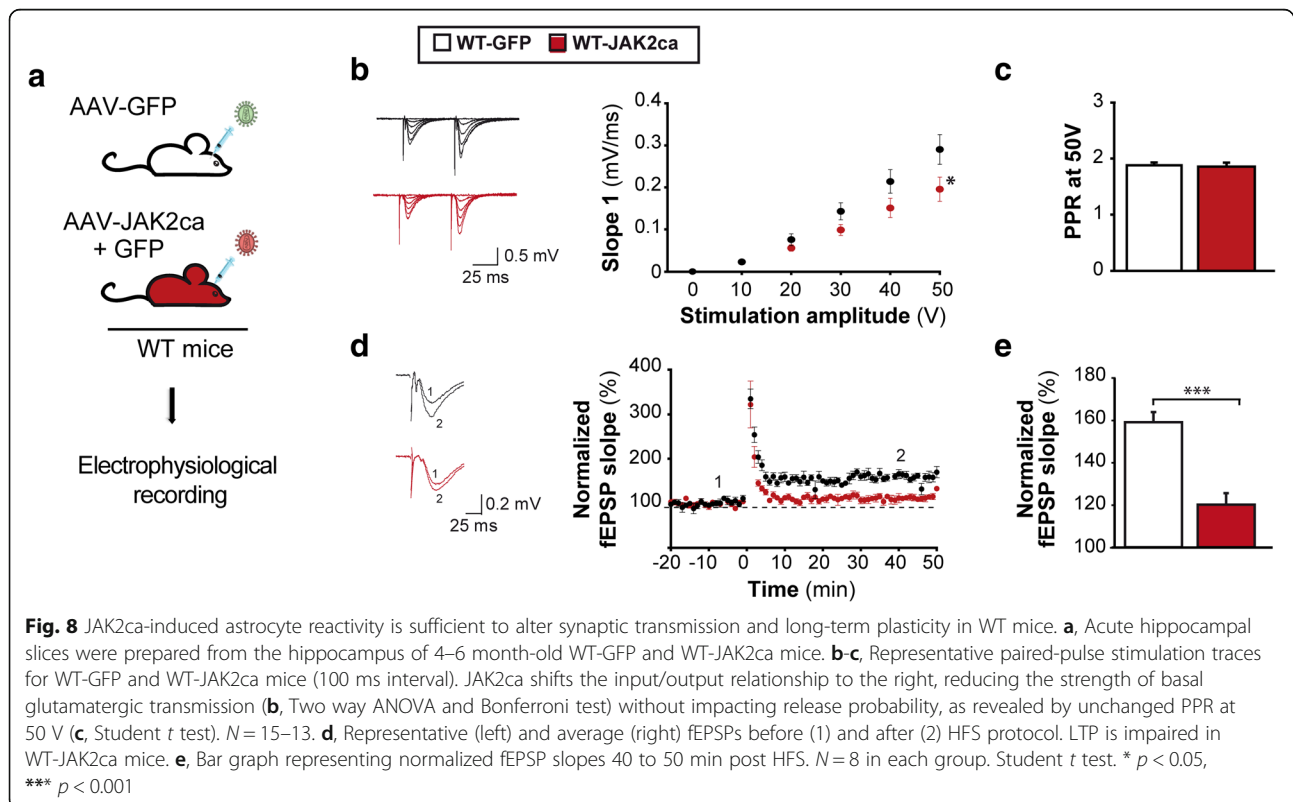
(See figure on previous page.)

Fig. 7 JAK2ca activates the JAK2-STAT3 pathway and induces astrocyte reactivity. **a**, WT mice were injected in the hippocampus with AAV-GFP alone ($N = 6$) or AAV-JAK2ca + AAV-GFP (JAK2ca + GFP, $N = 6$) at the same total viral titer and were studied 1–2 months later. **b**, Confocal images of hippocampal sections, stained for GFP (green) and STAT3 (cyan) in WT-GFP or WT-JAK2ca mice. JAK2ca induces STAT3 upregulation and nuclear accumulation in astrocytes, indicating STAT3 activation (arrowhead). **c**, STAT3 IR quantification in astrocyte nucleus from images in **b**. **d**, Representative low magnification images showing the transduced area (GFP⁺, green) and corresponding GFAP staining (magenta) in the hippocampus of WT-GFP and WT-JAK2ca mice. JAK2ca increases GFAP levels in a large part of the hippocampus (outlined). **e**, Confocal images of astrocytes stained for GFP (green), GFAP (magenta) and vimentin (red) in WT-GFP and WT-JAK2ca mice. JAK2ca increases GFAP and vimentin expression in hippocampal astrocytes and induces morphological changes. **f**, GFAP IR is increased by 70% in JAK2ca-injected hippocampus. **g**, Sholl analysis applied to GFAP-labelled astrocytes shows that reactive astrocytes in WT-JAK2ca mice have a larger domain area and a higher ramification index, a measure of cell complexity. **h**, RT-qPCR analysis was performed on acutely sorted hippocampal astrocytes from WT-GFP and WT-JAK2ca mice. *Jak2*, *Gfap* and *Serpina3n* are significantly overexpressed in WT-JAK2ca astrocytes. $N = 7$ /group. **c**, **f**, **g**, Student *t* test. **h**, *Gfap*, *Serpina3n*: Student *t* test, *Jak2*: Mann-Whitney test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

the JAK2-STAT3 pathway is necessary both for the induction and persistence of many aspects of astrocyte reactivity (Fig. 9). Contrary to conditional approaches used in acute injury models [4, 26, 61], our SOCS3-based strategy to block reactivity has the advantage of inhibiting only the JAK-dependent effects of STAT3, without impacting other non-canonical functions of STAT3 that do not require phosphorylation on Tyrosine 705 [12]. In addition, our virus-based method provides a local and time-controlled inhibition of the JAK-STAT3 pathway, avoiding peripheral or developmental side effects. SOCS3 is a specific inhibitor of the JAK-STAT3 cascade thanks to its dual recognition of JAK and the phosphorylated motif on the cytokine

receptor [6, 35]. We controlled that SOCS3 overexpression did not affect other signaling cascades. We did not find evidence for ERK or STAT1 activation in APP astrocytes and no further effect of SOCS3, suggesting that STAT3 is the main transcription factor regulated by SOCS3 in our conditions.

We found that SOCS3 regulates many genes linked to inflammation and immunity that are induced in astrocytes of AD mouse models (our data and [45, 62]) and in astrocytes of AD patient brains [62, 73]. In particular, several genes encoding cytokines and complement factors, which are associated with synaptic alterations and molecular defects characteristic of AD [25, 45, 78], were down-regulated by SOCS3.



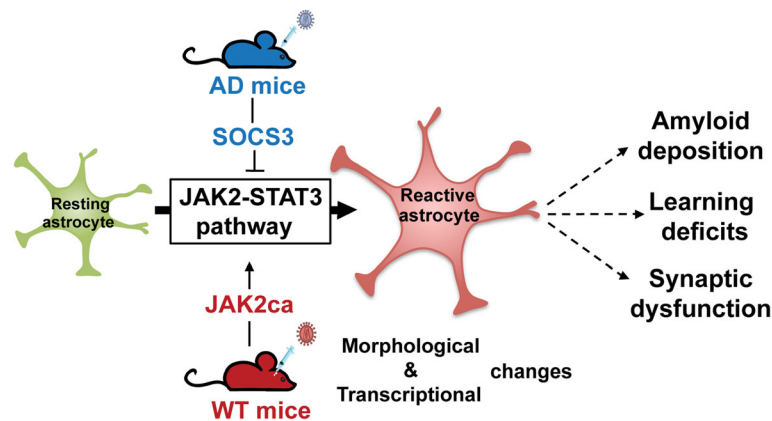


Fig. 9 The JAK2-STAT3 pathway is a master regulator of astrocyte reactivity that contributes to AD deficits. SOCS3-mediated inhibition of this cascade in AD mouse models blocked and even reversed morphological and molecular hallmarks of reactivity. Conversely, activation of the JAK2-STAT3 pathway by viral gene transfer of JAK2ca in WT mice was sufficient to induce those hallmarks. Inhibition of this cascade in AD mice reduced amyloid deposition, deficits in spatial learning and synaptic dysfunction, showing that reactive astrocytes significantly contribute to AD pathological outcomes

Interestingly, the induction of some SOCS3-regulated genes was shown to be dependent on STAT3, in a model of spinal cord injury in mice with an astrocyte-specific knock out of STAT3 [4]. Our study is of high therapeutic relevance for AD as it identifies the cascade controlling the transcription of neuroinflammatory genes by astrocytes. It will be important to measure how those inflammatory mediators are impacted by SOCS3 at the protein level.

Besides the JAK2-STAT3 pathway, other signaling cascades were reportedly activated during AD [7, 33]. But only a few cascades have been specifically manipulated in astrocytes to test their requirement for reactivity during AD. Constitutive activation of calcineurin in APP mice decreases astrocyte reactivity [19]. Surprisingly, the opposite manipulation of the calcineurin/Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT) pathway by expression of a blocking peptide in astrocytes also attenuates reactivity in the same mouse model [22], questioning the regulatory action of this pathway. Activation of the Nuclear Factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells (NF- κ B) pathway in astrocytes, through a conditional knock-out of the I κ B α inhibitor or by expression of a constitutively active IKK, increases glial reactivity in the cortex and hippocampus of WT and AD mice [44, 60]. But, to our knowledge, the specific inhibition of this cascade in astrocytes has not been performed in AD models. Overall, modulation of calcineurin/NFAT or NF- κ B pathways appear to have inconsistent, transient or moderate effects on astrocyte reactivity in AD models. On the contrary, we studied two mouse models of AD (APP and 3xTg) and observed consistent effects of JAK2-STAT3 pathway

modulation on astrocyte reactivity. Importantly, these effects were remarkably stable over time, lasting up to 9 months post-injection.

The concept of reactive astrocyte heterogeneity is emerging [3, 47], especially with the recent description of A1 and A2 subtypes of reactive astrocytes [48, 68, 76, 84]. Reactive astrocytes may thus form discrete subtypes with specific molecular and functional properties. The precise signaling pathways controlling these reactive states are still unknown. Unexpectedly, we found that SOCS3 regulates the expression of pan, A1 and A2 specific genes. In fact, the core WGCNA module of SOCS3-regulated genes contained all types of reactive markers. These results suggest that SOCS3 mediates a global inhibition of astrocyte reactivity, which operates beyond specific classes of reactive astrocytes. In this study, we did not explore the effects of SOCS3 in WT astrocytes, it will be interesting to see whether SOCS3 also regulates the transcriptome of astrocytes and some of their functions when they are not in an AD pathological environment.

Surprisingly, we found that inhibition of astrocyte reactivity in APP mice by SOCS3 did not impact the molecular and functional features of microglial cells. Microglia and astrocytes are engaged in complex bidirectional communications [25]. In particular, reactive microglial cells are reported to play a key role in triggering astrocyte reactivity in inflammatory conditions [70]. Our results, suggest that, at least in AD, reactive astrocytes do not significantly regulate microglial activation. Microglial cells may be already strongly activated by toxic amyloid proteins and neuronal dysfunction as occurring in AD.

Reactive astrocytes contribute to pathological outcomes in AD models

We found that inhibition of astrocyte reactivity by SOCS3 reduces the number of amyloid plaques in APP mice, a key pathological hallmark of AD. Intriguingly, the average size of plaques and the overall size distribution were not changed, suggesting that SOCS3 reduces amyloid seeding into plaques, but once amyloid plaques form, their growth and evolution are not impacted. Amyloid production, aggregation and clearance involve several brain cell types, including neurons that produce the bulk of A β peptides and microglial cells that actively degrade amyloid plaques. Astrocytes may produce low levels of A β as well [46] and are able to degrade amyloid plaques [37, 79, 82]. However, our FACS analysis evidenced no A β phagocytosis in astrocytes, and RNAseq data showed no increase in the expression of phagocytic receptors in astrocytes, suggesting that SOCS3-astrocytes do not contribute to A β phagocytosis. In addition, we ruled out microglial involvement in enhanced A β clearance in the SOCS3 group. Last, stable levels of soluble A β 40 and A β 42, as well as proteins involved in APP metabolism, suggest that A β production is not altered by JAK2-STAT3 pathway modulation in astrocytes. The molecular and cellular mechanisms responsible for the reduced number of amyloid plaques with SOCS3 are still unknown. Astrocytes were recently shown to contribute to A β elimination through the glymphatic system, which allows perivascular drainage of interstitial fluid to remove soluble brain waste [29]. SOCS3 could improve this clearance mechanism, thereby diverting soluble A β from aggregating into plaques. It is however quite difficult to test this hypothesis, as available methods to probe the glymphatic system lack spatial resolution to quantify SOCS3 local effects in the hippocampus.

We also report that SOCS3-mediated inhibition of astrocyte reactivity restores spatial learning on the Morris water maze, without correcting deficits in memory retrieval at 72 h. It is striking that expression of SOCS3 in only 25% of hippocampal astrocytes is able to restore spatial learning. Spatial learning is a hippocampal-dependent task [56], and it is now well documented that astrocytes are able to regulate hippocampal circuits and impact behavior [1, 66, 69]. However, the local action of AAV on hippocampal astrocytes may explain why long term memory was not corrected by AAV-SOCS3 in APP mice, because storage and retrieval of spatial memories mostly involve neocortical regions, which are not targeted by AAVs [52]. The finding that hippocampal astrocyte reactivity contributes to learning deficits in APP mice and is amenable to restoration by SOCS3 opens new therapeutic applications for AD.

Further demonstrating SOCS3 therapeutic potential, we found that its expression in astrocytes fully restored early synaptic and LTP alterations in 3xTg mice. Partial reduction in astrocyte reactivity by NFAT inhibition also improves synaptic transmission in aged APP mice [22]. Here, we uncover an implication of reactive astrocytes in the initial stages of synaptic dysfunction, before overt amyloid and Tau pathology, stressing the importance of astrocytes as therapeutic targets for AD. In accordance, we found that induction of astrocyte reactivity by JAK2ca was sufficient to induce synaptic deficits in WT mice, similar to those observed in 3xTg mice. Astrocytes regulate synaptic transmission by promoting ion homeostasis, recycling neurotransmitters or releasing active molecules such as gliotransmitters [5, 64, 65]. Some of these mechanisms are altered in AD mouse models [7, 15, 31] and could be restored by SOCS3. In addition, mRNA levels of several synaptotoxic complement factors [45, 78] were reduced by SOCS3. It is thus possible that SOCS3 normalizes several aspects of neuron-astrocyte interactions at the synapse, and further experiments will be needed to identify the exact mechanisms at play. Our model of JAK2ca-induced astrocyte reactivity will be helpful to isolate astrocyte-specific mechanisms of synaptic impairment.

The fact that JAK2-STAT3-mediated astrocyte reactivity contributes to three AD pathological outcomes contrasts with the beneficial effects of astrocytic STAT3 in spinal cord injury [4] or lack of effects after chemical lesions [58]. It is possible that some, but not all, astrocyte functions are regulated by this pathway. Depending on the disease context, STAT3-mediated astrocyte reactivity may thus have variable effects.

Conclusion

We show that the JAK2-STAT3 pathway is a core signaling cascade for the induction and maintenance of astrocyte reactivity. This pathway controls key morphological features and coordinates gene expression in reactive astrocytes. The JAK2-STAT3 pathway is a potent molecular target to establish the overall role of reactive astrocytes in CNS diseases. Our results show that in AD, reactive astrocytes are mostly deleterious, contributing to amyloid deposition, spatial learning deficits and synaptic dysfunction. Blocking astrocyte reactivity via the JAK2-STAT3 pathway offers new therapeutic opportunities for AD.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. AAV infect astrocytes selectively. To validate astrocyte tropism of the AAVs used in our study, an AAV2/9 encoding GFP was injected in the hippocampus of WT mice. GFP⁺ cells co-express the astrocytic marker GFAP and S100 β , but not NeuN, IBA1,

Olig2 and MBP, which are markers of neurons, microglial cells, cells of the oligodendrocyte lineage and myelinating oligodendrocytes, respectively. Astrocyte tropism of these vectors was confirmed in AD mice as well (See colocalization of GFP with GFAP in Figs. 1b and S2). (TIF 14477 kb)

Additional file 2: Table S1. Sequences of primers used for qPCR. (DOCX 17 kb)

Additional file 3: Figure S2. Unlike STAT3, STAT1 and Erk are not activated in APP astrocytes. Confocal images of stained hippocampal sections from 12-month-old WT-GFP, APP-GFP and APP-SOCS3 mice. **a**, GFP⁺ astrocytes (green) stained for GFAP (magenta) and STAT3 (cyan). APP astrocytes are reactive (hypertrophic and GFAP overexpression). They display STAT3 nuclear accumulation. SOCS3 reduces GFAP and STAT3 expression in APP mice, even around amyloid plaques (star). **b**, Quantification of STAT3 immunoreactivity in astrocyte soma. $N = 5-7/\text{group}$. One way ANOVA and Tukey's post hoc test. *** $p < 0.001$. **c-d**, Sections stained in magenta for STAT1 (**c**) or P-ERK (**d**), DAPI (blue) and GFP (green). STAT1 and P-ERK are not induced in APP reactive astrocytes while CNTF induces significant STAT1 nuclear accumulation (**c**) and LPS triggers ERK phosphorylation (**d**). DAPI stains nuclei as well as amyloid plaques. Representative images from $N = 4-6/\text{group}$. (TIF 15218 kb)

Additional file 4: Figure S3. Validation of astrocyte sorting. Normalized expression of cell type specific genes. GFP⁺ astrocytes are enriched in astrocyte markers while GFP⁻ cells, which comprise uninfected astrocytes, neurons, microglial cells and oligodendrocyte precursor cells (OPC) are enriched in other cell type markers. Oligodendrocyte markers are undetectable due to the myelin removal step. $N = 3-7/\text{group}$. Wald test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, # $p < 10^{-20}$, ### $p < 10^{-40}$. (TIF 12358 kb)

Additional file 5: Table S2. WGCNA: Top 20 most connected genes regulated by SOCS3 in APP astrocytes. Three of the top 20 hub genes, highlighted in bold, are pan or A1 reactive astrocyte genes. (DOCX 17 kb)

Additional file 6: Figure S4. SOCS3 regulates gene networks linked to reactivity in APP astrocytes. The top 100 most connected genes of the WGCNA module were analyzed for protein-protein interaction networks with STRING. Groups of proteins related to complement system and inflammation, cytoskeleton and cell adhesion were found co-regulated by SOCS3 (circles). Protein-protein interaction p value $< 10^{-6}$. (TIF 54618 kb)

Additional file 7: Figure S5. Modulation of the JAK2-STAT3 pathway does not change expression of proteins involved in A β production and clearance in APP mice. Representative western blottings on protein homogenates prepared from WT-GFP, APP-GFP, APP-SOCS3 and APP-JAK2ca mice. The expression of human (hAPP) (**a**), BACE1 (**b**), IDE (**c**) and ApoE (**d**) are stable across the groups (protein levels are normalized by actin or tubulin **a**). $N = 3-8/\text{group}$. **a**, Student t test, **b-d**, ANOVA or Kruskal-Wallis tests. (TIF 10130 kb)

Additional file 8: Table S3. Expression of phagocytic receptors and genes in astrocytes RNAseq analysis of astrocytes shows that most genes involved in A β phagocytosis are expressed at similar levels in all groups. Only mRNA levels for three Fc receptors are down-regulated by SOCS3. Data are presented as normalized mRNA levels $\pm$ SEM. ## $p < 0.01$ versus WT-GFP, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus APP-GFP. Wald test. (DOCX 18 kb)

Acknowledgments

We thank Drs. N. Robil and P. de la Grange from Genosplice Technology® for bioinformatics analysis of RNAseq data. We thank Profs. Haan, Bjørnbæk and Shoelson for sharing JAK2ca and SOCS3 plasmids. We thank Drs. S. Alves and N. Cartier for sharing their IDE antibody. We thank L. Vincent, K. Bastide, P. Woodling and J.M. Hélias for their help with mouse housing and transfer to Bordeaux; C. Garin and C. Duffeant for help with the APP/PS1dE9 colony. We are grateful to F. Aubry for help with initial AAV vector cloning and FACS experiments; D. Cheramy and Dr. E. Diquet (Servier) for sharing their expertise and equipment for MSD® kits; Dr. L. Juricek and Dr. C. Jan for help with pilot experiments and Prof. N. Déglon for technical input at the initial part of the project. We acknowledge the help of V. Lavilla and C. Dulary on transcriptomic studies; D. Bacq and the QC team, the informatic and bio-informatic teams at the CNRGH. We thank D. Gonzales, S. Laumond, J. Tessaire and the NeuroCentre Magendie mouse facility staff for mouse care and

genotyping. We are grateful to Dr. L. Schirmer for his comments and careful reading of an earlier version of the manuscript.

Funding

This study was supported by CEA, CNRS and grants from the French National Research Agency (grants # 2010-JCJC-1402-1, 2011-BSV4-021-03 and ANR-16-TERC-0016-01 to C.E. and 2011-INBS-0011 NeurATRIS to P.H.), from Fondation Vaincre Alzheimer (grant # FR-15015, to C. E.), Laboratory of Excellence in Medical Genomics: GENMED (to J-F.D.) as well as CNRS and INSERM (to S.H.R.O. and A.P.) and Association France Alzheimer and Fondation de France (Prix Spécial 2012 to G.B.). C.E. and A.P. received support from the Fédération pour la Recherche sur le Cerveau. K. Ceyzériat, L. Ben Haim and O. Guillemaud are recipients of a doctoral fellowship from the CEA.

Availability of data and materials

RNAseq dataset is deposited on the GEO server under reference GSE108520.

Authors' contributions

KCe, LBH, performed experiments, analyzed data and wrote the manuscript. AD, DP, MM, VL, JV performed and analyzed electrophysiological recordings. OG, LA performed experiments and analyzed data. MAP performed RNAseq experiments. PG, FP performed some histological stainings. MCG contributed to primer design and vector cloning. MGu, SB, GA, MGa helped with mouse surgery and breeding. CJ produced viral vectors. ND, JB performed cell sorting. KCa supervised the Morris water maze test. ABe supervised viral vector production. GB provided 3xTg mice. MD provided APP mice. GB, SHRO, JFD, PH, EB provided additional funding. MACS performed experiments, analyzed data and supervised some experiments. RO designed and supervised transcriptomic experiments. AP designed, analyzed and supervised electrophysiological recordings and wrote the manuscript. CE designed the study, obtained funding, analyzed data and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

All experimental protocols were reviewed and approved by the local ethics committee (CETEA N°44) and submitted to the French Ministry of Education and Research (Approvals # APAFIS#4565-20 16031711426915 v3, APAFIS#4503-2016031409023019). They were performed in a facility authorized by local authorities (authorization #B92-032-02), in strict accordance with recommendations of the European Union (2010-63/EEC).

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

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

Author details

¹Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Département de la Recherche Fondamentale, Institut de Biologie François Jacob, MIRCen, 92260 Fontenay-aux-Roses, France. ²Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris-Sud, UMR 9199, Neurodegenerative Diseases Laboratory, 92260 Fontenay-aux-Roses, France. ³Neurocentre Magendie, INSERM U1215, 33077 Bordeaux, France. ⁴Université de Bordeaux, 33077 Bordeaux, France. ⁵Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Département de la Recherche Fondamentale, Institut de Biologie François Jacob, Centre National de Recherche en Génomique Humaine (CNRGH), F-91057 Evry, France. ⁶CEA-INSERM Université Paris-Diderot and Université Paris-Sud, Paris, France. ⁷Université Paris-Diderot et Université Paris-Sud, Paris, France. ⁸Present address: F.M. Kirby Neurobiology Center, Boston Children's Hospital, and Department of Neurology, Harvard Medical School, Boston, USA.

Received: 30 August 2018 Accepted: 24 September 2018

Published online: 16 October 2018

References

- Adamsky A, Kol A, Kreisel T, Doron A, Ozeri-Engelhard N, Melcer T et al (2018) Astrocytic activation generates De novo neuronal potentiation and memory enhancement. *Cell* 174:59–71 e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.002>
- Allaman I, Gavillet M, Belanger M, Laroche T, Viertl D, Lashuel HA et al (2010) Amyloid-beta aggregates cause alterations of astrocytic metabolic phenotype: impact on neuronal viability. *J Neurosci* 30:3326–3338. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5098-09.2010>
- Anderson MA, Ao Y, Sofroniew MV (2014) Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett* 565:23–29. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.030>
- Anderson MA, Burda JE, Ren Y, Ao Y, O'Shea TM, Kawaguchi R et al (2016) Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* 532:195–200. <https://doi.org/10.1038/nature17623>
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SH, Robitaille R, Volterra A (2014) Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81:728–739. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.007>
- Babon JJ, Kershaw NJ, Murphy JM, Varghese LN, Laktyushin A, Young SN et al (2012) Suppression of cytokine signaling by SOCS3: characterization of the mode of inhibition and the basis of its specificity. *Immunity* 36:239–250. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.015>
- Ben Haim L, Carrillo-de Sauvage MA, Ceyzeriat K, Escartin C (2015) Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci* 9:278. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00278>
- Ben Haim L, Ceyzeriat K, Carrillo-de Sauvage MA, Aubry F, Auregan G, Guillemier M et al (2015) The JAK/STAT3 pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's diseases. *J Neurosci* 35:2817–2829. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3516-14.2015>
- Burda JE, Sofroniew MV (2014) Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 81:229–248. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.034>
- Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS et al (2008) A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* 28:264–278. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008>
- Cantarella G, Di Benedetto G, Puzzo D, Privitera L, Loreto C, Saccone S et al (2015) Neutralization of TNF α ameliorates functional outcome in a murine model of Alzheimer's disease. *Brain* 138:203–216. <https://doi.org/10.1093/brain/awu318>
- Ceyzeriat K, Abjean L, Carrillo-de Sauvage MA, Ben Haim L, Escartin C (2016) The complex STATes of astrocyte reactivity: how are they controlled by the JAK-STAT3 pathway? *Neuroscience* 330:205–218. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.043>
- Chun H, Lee CJ (2018) Reactive astrocytes in Alzheimer's disease: a double-edged sword. *Neurosci Res* 126:44–52. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.11.012>
- Clarke LE, Liddelow SA, Chakraborty C, Munch AE, Heiman M, Barres BA (2018) Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E1896–E1905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800165115>
- Delekate A, Fuchtemeier M, Schumacher T, Ulbrich C, Foddiss M, Petzold GC (2014) Metabotropic P2Y₁ receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. *Nat Commun* 5:5422. <https://doi.org/10.1038/ncomms5422>
- Ding Y, Qiao A, Wang Z, Goodwin JS, Lee ES, Block ML et al (2008) Retinoic acid attenuates beta-amyloid deposition and rescues memory deficits in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. *J Neurosci* 28:11622–11634. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3153-08.2008>
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S et al (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29:15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Escartin C, Brouillet E, Gubellini P, Trioulier Y, Jacquard C, Smadja C et al (2006) Ciliary neurotrophic factor activates astrocytes, redistributes their glutamate transporters GLAST and GLT-1 to raft microdomains, and improves glutamate handling in vivo. *J Neurosci* 26:5978–5989
- Fernandez AM, Jimenez S, Mecha M, Davila D, Guaza C, Vitorica J et al (2012) Regulation of the phosphatase calcineurin by insulin-like growth factor I unveils a key role of astrocytes in Alzheimer's pathology. *Mol Psychiatry* 17:705–718. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.128>
- Ferreira TA, Blackman AV, Oyler J, Jayabal S, Chung AJ, Watt AJ et al (2014) Neuronal morphometry directly from bitmap images. *Nat Methods* 11:982–984. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3125>
- Fol R, Braudeau J, Ludewig S, Abel T, Weyer SW, Roederer JP et al (2016) Viral gene transfer of APP α rescues synaptic failure in an Alzheimer's disease mouse model. *Acta Neuropathol* 131:247–266. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1498-9>
- Furman JL, Sama DM, Gant JC, Beckett TL, Murphy MP, Bachstetter AD et al (2012) Targeting astrocytes ameliorates neurologic changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 32:16129–16140. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2323-12.2012>
- Haan S, Wuller S, Kaczor J, Rolvering C, Nocker T, Behrmann I et al (2009) SOCS-mediated downregulation of mutant Jak2 (V617F, T875N and K539L) counteracts cytokine-independent signaling. *Oncogene* 28:3069–3080
- Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184–185
- Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL et al (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 14:388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- Herrmann JE, Imura T, Song B, Qi J, Ao Y, Nguyen TK et al (2008) STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J Neurosci* 28:7231–7243
- Hol EM, Pekny M (2015) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol* 32:121–130. <https://doi.org/10.1016/j.jceb.2015.02.004>
- Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4:44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>
- Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA et al (2012) A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. *Sci Transl Med* 4:147ra111. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003748>
- Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA et al (2004) Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet* 13:159–170. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh019>
- Jo S, Yarishkin O, Hwang YJ, Chun YE, Park M, Woo DH et al (2014) GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Med*. <https://doi.org/10.1038/nm.3639>
- Kamphuis W, Kooijman L, Orre M, Stassen O, Pekny M, Hol EM (2015) GFAP and vimentin deficiency alters gene expression in astrocytes and microglia in wild-type mice and changes the transcriptional response of reactive glia in mouse model for Alzheimer's disease. *Glia*. <https://doi.org/10.1002/glia.22800>
- Kang W, Hebert JM (2011) Signaling pathways in reactive astrocytes, a genetic perspective. *Mol Neurobiol* 43:147–154. <https://doi.org/10.1007/s12035-011-8163-7>
- Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Sternfeld R, Ulland TK et al (2017) A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease. *Cell* 169:1276–1290 e1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.018>
- Kershaw NJ, Murphy JM, Liao NP, Varghese LN, Laktyushin A, Whitlock EL et al (2013) SOCS3 binds specific receptor-JAK complexes to control cytokine signaling by direct kinase inhibition. *Nat Struct Mol Biol* 20:469–476. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2519>
- Kim D, Kim SH, Cho SH, Shin K, Kim S (2011) SOCS3 suppresses the expression of IL-4 cytokine by inhibiting the phosphorylation of c-Jun through the ERK signaling pathway in rat mast cell line RBL-2H3. *Mol Immunol* 48:776–781. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.11.005>
- Koistinaho M, Lin S, Wu X, Esterman M, Koger D, Hanson J et al (2004) Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat Med* 10:719–726. <https://doi.org/10.1038/nm1058>

38. Kraft AW, Hu X, Yoon H, Yan P, Xiao Q, Wang Y et al (2013) Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. *FASEB J* 27:187–198. <https://doi.org/10.1096/fj.12-208660>
39. Krauthausen M, Kummer MP, Zimmermann J, Reyes-Irisarri E, Terwel D, Bulic B et al (2015) CXCR3 promotes plaque formation and behavioral deficits in an Alzheimer's disease model. *J Clin Invest* 125:365–378. <https://doi.org/10.1172/JCI66771>
40. Langfelder P, Horvath S (2008) WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinform* 9:559. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559>
41. LeComte MD, Shimada IS, Sherwin C, Spees JL (2015) Notch1-STAT3-ETBR signaling axis controls reactive astrocyte proliferation after brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:8726–8731. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501029112>
42. Lee CY, Landreth GE (2010) The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm* 117:949–960. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0433-4>
43. Lee Y, Messing A, Su M, Brenner M (2008) GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia* 56:481–493. <https://doi.org/10.1002/glia.20622>
44. Lian H, Litvinchuk A, Chiang AC, Aithmitti N, Jankowsky JL, Zheng H (2016) Astrocyte-microglia cross talk through complement activation modulates amyloid pathology in mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 36: 577–589. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2117-15.2016>
45. Lian H, Yang L, Cole A, Sun L, Chiang AC, Fowler SW et al (2015) NF-kappaB-activated Astroglial release of secreted Abeta and sAPPalpha from human IPSC-derived neurons and astrocytes. *J Neurosci* 36:1730–1746. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2735-15.2016>
47. Liddelow SA, Barres BA (2017) Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential. *Immunity* 46:957–967. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>
48. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L et al (2017) Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541:481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
49. Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
50. Marchetti C, Marie H (2011) Hippocampal synaptic plasticity in Alzheimer's disease: what have we learned so far from transgenic models? *Rev Neurosci* 22:373–402. <https://doi.org/10.1515/RNS.2011.035>
51. Masliah E, Alford M, DeTeresa R, Mallory M, Hansen L (1996) Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 40:759–766. <https://doi.org/10.1002/ana.410400512>
52. Maviel T, Durkin TP, Menzaghi F, Bontempi B (2004) Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 305:96–99. <https://doi.org/10.1126/science.1098180>
53. McManus MJ, Murphy MP, Franklin JL (2011) The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ prevents loss of spatial memory retention and early neuropathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 31:15703–15715. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0552-11.2011>
54. Mertens C, Darnell JE Jr (2007) SnapShot: JAK-STAT signaling. *Cell* 131:612. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.033>
55. Morizawa YM, Hirayama Y, Ohno N, Shibata S, Shigetomi E, Sui Y et al (2017) Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. *Nat Commun* 8:28. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00037-1>
56. Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681–683
57. Noli L, Capalbo A, Ogilvie C, Khalaf Y, Illic D (2015) Discordant growth of monozygotic twins starts at the blastocyst stage: a case study. *Stem Cell Reports* 5:946–953. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.10.006>
58. O'Callaghan JP, Kelly KA, VanGilder RL, Sofroniew MV, Miller DB (2014) Early activation of STAT3 regulates reactive astrogliosis induced by diverse forms of neurotoxicity. *PLoS One* 9:e102003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102003>
59. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R et al (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39:409–421. Doi: S0896627303004343
60. Oeckl P, Lattke M, Wirth T, Baumann B, Ferger B (2012) Astrocyte-specific IKK2 activation in mice is sufficient to induce neuroinflammation but does not increase susceptibility to MPTP. *Neurobiol Dis* 48:481–487. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.06.010>
61. Okada S, Nakamura M, Katoh H, Miyao T, Shimazaki T, Ishii K et al (2006) Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat Med* 12:829–834
62. Orre M, Kamphuis W, Osborn LM, Jansen AH, Kooijman L, Bossers K et al (2014) Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiol Aging* 35:2746–2760. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.06.004>
63. Osborn LM, Kamphuis W, Wadman WJ, Hol EM (2016) Astroglial: an integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 144:121–141. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.01.001>
64. Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA et al (2006) Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125:775–784
65. Panatier A, Vallee J, Haber M, Murai KK, Lacaille JC, Robitaille R (2011) Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell* 146:785–798. Doi: S0092-8674(11)00820-8 [pii]. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.022>
66. Papouin T, Dunphy JM, Tolman M, Dineley KT, Haydon PG (2017) Septal cholinergic Neuromodulation tunes the astrocyte-dependent gating of hippocampal NMDA receptors to wakefulness. *Neuron* 94:840–854 e847. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.021>
67. Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhauser C, Lee JM, Pappas V et al (2015) Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol.* <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1513-1>
68. Priego N, Zhu L, Monteiro C, Mulders M, Wasilewski D, Bindeman W et al (2018) STAT3 labels a subpopulation of reactive astrocytes required for brain metastasis. *Nat Med.* <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0044-4>
69. Robin LM, Oliveira da Cruz JF, Langlais VC, Martin-Fernandez M, Metna-Laurent M, Busquets-Garcia A et al (2018) Astroglial CB1 receptors determine synaptic D-serine availability to enable recognition memory. *Neuron* 98:935–944 e935. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.04.034>
70. Rothhammer V, Borucki DM, Tjon EC, Takenaka MC, Chao CC, Arduina-Fabregat A et al (2018) Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature* 557:724–728. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0119-x>
71. Rothhammer V, Manciasfroni ID, Bunse L, Takenaka MC, Kenison JE, Mayo L et al (2016) Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nat Med* 22:586–597. <https://doi.org/10.1038/nm.4106>
72. Sancheti H, Patil I, Kanamori K, Diaz Brinton R, Zhang W, Lin AL et al (2014) Hypermetabolic state in the 7-month-old triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease and the effect of lipoic acid: a 13C-NMR study. *J Cereb Blood Flow Metab* 34:1749–1760. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.137>
73. Sekar S, McDonald J, Cuyugan L, Aldrich J, Kurdoglu A, Adkins J et al (2015) Alzheimer's disease is associated with altered expression of genes involved in immune response and mitochondrial processes in astrocytes. *Neurobiol Aging* 36:583–591. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.027>
74. Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298:789–791. <https://doi.org/10.1126/science.1074069>
75. Sharma K, Schmitt S, Bergner CG, Tyanova S, Kannaiyan N, Manrique-Hoyos N et al (2015) Cell type- and brain region-resolved mouse brain proteome. *Nat Neurosci* 18:1819–1831. <https://doi.org/10.1038/nn.4160>
76. Shi Y, Yamada K, Liddelow SA, Smith ST, Zhao L, Luo W et al (2017) ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Nature* 549:523–527. <https://doi.org/10.1038/nature24016>
77. Sompoll P, Furman JL, Pleiss MM, Kraner SD, Artiushin IA, Batten SR et al (2017) Calcineurin/NFAT signaling in activated astrocytes drives network Hyperexcitability in Abeta-bearing mice. *J Neurosci* 37:6132–6148. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0877-17.2017>
78. Stephan AH, Barres BA, Stevens B (2012) The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease.

- Annu Rev Neurosci 35:369–389. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113810>
79. Thal DR, Hartig W, Schober R (1999) Diffuse plaques in the molecular layer show intracellular α beta(8-17)-immunoreactive deposits in subpial astrocytes. *Clin Neuropathol* 18:226–231
 80. Tyzack GE, Hall CE, Sibley CR, Cymes T, Forostyak S, Carlino G et al (2017) A neuroprotective astrocyte state is induced by neuronal signal EphB1 but fails in ALS models. *Nat Commun* 8:1164. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01283-z>
 81. Wan J, Fu AK, Ip FC, Ng HK, Hugon J, Page G et al (2010) Tyk2/STAT3 signaling mediates beta-amyloid-induced neuronal cell death: implications in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 30:6873–6881. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0519-10.2010>
 82. Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F et al (2003) Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* 9:453–457
 83. Ye B, Shen H, Zhang J, Zhu YG, Ransom BR, Chen XC et al (2015) Dual pathways mediate beta-amyloid stimulated glutathione release from astrocytes. *Glia* 63:2208–2219. <https://doi.org/10.1002/glia.22886>
 84. Yun SP, Kam TI, Panicker N, Kim S, Oh Y, Park JS et al (2018) Block of A1 astrocyte conversion by microglia is neuroprotective in models of Parkinson's disease. *Nat Med*. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0051-5>
 85. Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG et al (2012) Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci* 32:6391–6410. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012>

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



II. Rôle complexe des astrocytes réactifs dans le modèle murin 3xTg de la maladie d'Alzheimer

Complex roles for reactive astrocytes in the triple transgenic mouse model of Alzheimer disease – *Neurobiology of aging* – 2020 – *doi: 10.1016/j*.

Océane Guillemaud*, Kelly Ceyzériat*, Thomas Saint-Georges, Karine Cambon, Fanny Petit, Lucile Ben Haim, Maria-Angeles Carrillo-de Sauvage, Martine Guillermier, Sueva Bernier, Anne-Sophie Hérard, Charlène Joséphine, Alexis Pierre Bémelmans, Emmanuel Brouillet, Philippe Hantraye, Gilles Bonvento, Carole Escartin.

* Contributions égales.

1. Contexte, objectif et synthèse de l'article 2

Dans l'article précédent, nous avons révélé un rôle délétère des astrocytes réactifs sur plusieurs index de la pathologie dans un modèle murin de la maladie, les souris APP. Nous avons également révélé un effet délétère sur la transmission et la plasticité synaptique dans les souris 3xTg qui, contrairement aux souris APP, présentent la pathologie Tau en plus de la pathologie amyloïde (Oddo et al., 2003). Afin de mieux comprendre le rôle des astrocytes réactifs dans ce contexte pathologique différent, nous avons étudié les conséquences de la modulation de la réactivité dans les souris 3xTg. Nous avons ainsi mieux caractériser ce modèle au niveau histopathologique et comportemental. Les objectifs de cette étude étaient donc de 1) évaluer l'influence des astrocytes réactifs sur les pathologies amyloïdes et Tau à différents stades de la maladie et 2) étudier les conséquences de la modulation de la réactivité astrocytaire sur les fonctions cognitives.

Nous avons profité de la versatilité de nos vecteurs viraux afin de cibler spécifiquement les astrocytes dans l'hippocampe de souris 3xTg. Les souris ont été injectées avec un AAV-SOCS3 pour désactiver les astrocytes ou un AAV-JAK2 afin d'amplifier la réactivité. Après avoir validé l'efficacité de ces vecteurs dans le modèle 3xTg, nous avons pu étudier les effets de la modulation de la réactivité.

Contrairement à ce que l'on a montré chez les souris APP, la modulation de la réactivité chez les souris 3xTg n'a pas d'effet sur la pathologie amyloïde ni la pathologie Tau aussi bien à des stades précoces que tardifs de la maladie. Au niveau comportemental, les déficits de mémoire ne sont pas corrigés par SOCS3. Seule une diminution de l'anxiété dans le labyrinthe en croix surélevée est observée suite à l'inhibition des astrocytes réactifs. Ainsi ces résultats montrent que la modulation de la réactivité astrocytaire dans les souris 3xTg n'a pas d'effet majeur sur les altérations moléculaires mais réduit de manière inattendue l'anxiété.

2. Contributions à l'article 2

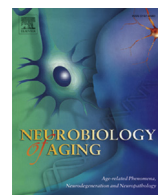
Dans cet article, j'ai réalisé l'ensemble des expériences post-mortem (quantifications Tau soluble, A β soluble, Tau agrégé, plaques amyloïdes, nombre de microglies autour des plaques amyloïdes). Les analyses comportementales ont été réalisées par une ancienne doctorante, Kelly Ceyzériat, qui a initié ces études. Kelly Ceyzériat a également participé à la validation des vecteurs viraux dans ce modèle 3xTg. Nous avons

toutes les deux participé à la rédaction de l'article ainsi que la réalisation de l'ensemble des figures.

3. Conclusions

Cette étude souligne à nouveau l'importance de la voie JAK2-STAT3 et sa versatilité dans le contrôle de la réactivité astrocytaire dans différents contextes pathologiques de la maladie, avec ou sans la pathologie Tau. En modulant cette voie dans les souris 3xTg, nous avons montré une absence d'effet sur la pathologie amyloïde et la pathologie Tau, suggérant que les astrocytes réactifs sont des cellules à multiple facettes avec des effets fonctionnels subtils, dépendants du contexte pathologique.

4. Article 2



Complex roles for reactive astrocytes in the triple transgenic mouse model of Alzheimer disease



Océane Guillemaud, Kelly Ceyzériat, Thomas Saint-Georges, Karine Cambon, Fanny Petit, Lucile Ben Haim, Maria-Angeles Carrillo-de Sauvage, Martine Guillemier, Sueva Bernier, Anne-Sophie Hérard, Charlène Joséphine, Alexis Pierre Bémelmans, Emmanuel Brouillet, Philippe Hantraye, Gilles Bonvento, Carole Escartin*

Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, MIRCen, Laboratoire des Maladies Neurodégénératives, Fontenay-aux-Roses, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 October 2019

Received in revised form 6 February 2020

Accepted 12 February 2020

Available online 18 February 2020

Keywords:

Reactive astrocytes

Alzheimer disease

Tau

JAK-STAT3 pathway

SOCS3

Neuroinflammation

ABSTRACT

In Alzheimer disease (AD), astrocytes undergo complex changes and become reactive. The consequences of this reaction are still unclear. To evaluate the net impact of reactive astrocytes in AD, we developed viral vectors targeting astrocytes that either activate or inhibit the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription 3 (JAK2-STAT3) pathway, a central cascade controlling astrocyte reaction. We aimed to evaluate whether reactive astrocytes contribute to tau as well as amyloid pathologies in the hippocampus of 3xTg-AD mice, an AD model that develops tau hyper-phosphorylation and amyloid deposition. JAK2-STAT3 pathway-mediated modulation of reactive astrocytes in 25% of the hippocampus of 3xTg-AD mice did not significantly influence tau phosphorylation or amyloid processing and deposition at early, advanced, and terminal disease stage. Interestingly, inhibition of the JAK2-STAT3 pathway in hippocampal astrocytes did not improve spatial memory in the Y maze but it did reduce anxiety in the elevated plus maze. Our unique approach to specifically manipulate reactive astrocytes in situ show they may impact behavioral outcomes without influencing tau or amyloid pathology.

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Alzheimer disease (AD) is a devastating neurodegenerative disease and the most common form of dementia (Querfurth and LaFerla, 2010). It is characterized by extracellular accumulation of amyloid plaques, tau hyper-phosphorylation, synaptic alterations, and neuronal degeneration. The exact mechanisms responsible for AD are still disputed (Sala Frigerio and De Strooper, 2016). The amyloid cascade hypothesis was first to be put forward. Here, successive cleavages of the amyloid precursor protein (APP) by β - and γ -secretases generate high levels of soluble amyloid beta (A β) peptides. These peptides then oligomerize and form amyloid

plaques in the brain of AD patients and can cause synaptic dysfunction, neurodegeneration, and cognitive impairment (Hardy and Higgins, 1992). The amyloid hypothesis was later refined to include tau hyper-phosphorylation as a key pathogenic element (Kametani and Hasegawa, 2018; Medina and Avila, 2014). Hyper-phosphorylated tau proteins can also oligomerize and form neurofibrillary tangles that inhibit microtubule assembly and alter neuronal functions. Indeed, progression of tau pathology from the entorhinal cortex to other isocortex regions (Braak and Braak, 1991) correlates better than amyloid pathology with cognitive impairment observed in patients (Arriagada et al., 1992; Masters et al., 2015).

Recently, evidence has emerged showing that AD is not only caused by cell-autonomous processes within neurons, and that glial cells may also play an instrumental role in disease progression (Arranz and De Strooper, 2019; De Strooper and Karran, 2016; Heneka et al., 2015). In particular, astrocytes perform a number of key brain functions, including neurotransmitter recycling, ion homeostasis, metabolic and trophic support (Verkhratsky and Nedergaard, 2018). In the brain of AD patients or in animal models, astrocytes are reactive and participate in neuroinflammation. Reactive astrocytes are classically characterized by morphological changes (hypertrophy and process reorganization), as well as upregulation of intermediate

Océane Guillemaud and Kelly Ceyzériat contributed equally.

Present address of Kelly Ceyzériat: Division of Adult Psychiatry, Department of Psychiatry, University Hospitals of Geneva, Geneva, Switzerland and Division of Nuclear Medicine, University Hospitals of Geneva, Geneva University, Geneva, Switzerland.

Declarations of interest: none.

* Corresponding author at: Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Département de la Recherche Fondamentale, Institut de Biologie François Jacob, MIRCen, 18 Route du Panorama, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France. Tel.: 0033 1 46 54 72 33; fax: 0033 1 46 54 91 16.

E-mail address: carole.escartin@cea.fr (C. Escartin).

filament proteins [glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin; [Hol and Pekny, 2015](#)]. Much less is known about their functional features and exactly how they impact AD outcomes ([Ben Haim et al., 2015a](#)). Several studies have reported alterations in some of the multiple functions operated by astrocytes such as glutamate uptake ([Masliah et al., 1996](#)), metabolic supply ([Allaman et al., 2010](#); [Sancheti et al., 2014](#)), production of antioxidant molecules ([Abeti et al., 2011](#); [Allaman et al., 2010](#)), or regulation of synaptic transmission ([Delekate et al., 2014](#); [Jo et al., 2014](#); [Lian et al., 2015](#); [Wu et al., 2014](#)); for recent reviews see [Ben Haim et al. \(2015a\)](#) and [Chun and Lee \(2018\)](#). Interestingly, astrocytes may directly participate in APP metabolism and A β clearance through various mechanisms, ranging from extracellular cleavage to phagocytosis or drainage through the glymphatic system ([Ries and Sastre, 2016](#)). But how these clearance mechanisms are altered when astrocytes acquire reactive features during AD progression is still unknown. Similarly, the exact impact of reactive astrocytes on tau hyper-phosphorylation and aggregation remains to be established ([Kahlson and Colodner, 2015](#); [Leyns and Holtzman, 2017](#)).

We recently developed a method that efficiently blocks morphological and molecular changes in reactive astrocytes, by inhibiting the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription 3 (JAK-STAT3) pathway, through astrocyte-specific expression of its inhibitor suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3; [Ceyzériat et al., 2018](#)). We showed that reactive astrocytes promote amyloid deposition and learning deficits in the APP/PS1dE9 transgenic mouse model of AD, and early synaptic deficits in 3xTg-AD mice, another transgenic model that also develops tau pathology.

Here, we aimed to evaluate in 3xTg-AD mice, whether reactive astrocytes (1) influence tau and amyloid pathologies at different disease stages and (2) have long-term effects on cognitive functions. Unexpectedly, we found that JAK2-STAT3 activation in reactive astrocytes does not affect tau or amyloid pathology in 3xTg-AD mice at early, advanced, and terminal disease stages. In addition, inhibition of reactive astrocytes does not improve working memory but it does reduce anxiety in 3xTg-AD mice.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Triple transgenic AD (here referred to as 3xTg mice) mice express human APP^{swe} and human Tau^{P301L} under a Thy-1 promoter as well as a point mutation on the mouse *Psen1* gene (PS1^{M146V}), on a mixed C57BL/6J $\times$ 129Sv background ([Oddo et al., 2003](#)). C57BL/6J $\times$ 129Sv mice were used as controls. Only females were used in this study, as they display earlier neuropathology ([Carroll et al., 2010](#); [Hirata-Fukae et al., 2008](#)). Breeding pairs were obtained from the Mutant Mouse Regional Resource Centers. All experimental protocols were approved by a local ethics committee (CETEA No. 44) and submitted to the French Ministry of Education and Research (Approvals # APAFIS#4565-2016031711426915 v3 and APAFIS#4503-2016031409023019). They were performed in an authorized facility (#D92-032-02), under the supervision of a veterinarian and in strict accordance with the recommendations of the European Union (2010-63/EEC) for the care and use of laboratory animals. All efforts were made to promote animal welfare. Mice were housed under standard environmental conditions (12-hour light-dark cycle, temperature 22 ± 1 °C, and humidity 50%) with ad libitum access to food and water. Mice of the appropriate genotype were randomly allocated to experimental groups.

2.2. Stereotactic injections of viral vectors

Adeno-associated viruses of serotype 9 (AAV2/9) encoding Green fluorescent protein (Gfp), murine *Socs3*, or a constitutively active form of *Jak2* (JAK2^{T875N}, aka JAK2ca) were produced and titrated at the MIRCen viral vector facility, as described previously ([Ceyzériat et al., 2018](#)). All transgenes were under the control of the gfaABC1D promoter, which drives specific expression in astrocytes, including those of the dorsal hippocampus, where the viral vectors were delivered ([Ceyzériat et al., 2018](#)) (Fig. 1A, Supplemental Fig. 1).

Before surgery, mice were anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and received a subcutaneous injection of lidocaine (7 mg/kg) at the incision site, 10 minutes before injection. Mice received paracetamol in drinking water (1.6 mg/mL) for 48 hours after surgery. AAV was diluted in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) with 0.001% pluronic acid, at a final total concentration of 2.5×10^9 viral genome/ μ L. Mice were positioned on a stereotactic apparatus with tooth bar set at 0 mm. They were injected in the CA1 region of the hippocampus (coordinates: -3 mm anteroposterior, ± 3 mm lateral, and -1.5 mm ventral, from dura) with 2 μ L of AAV suspensions at a rate of 0.2 μ L/min. After 5 minutes, the cannula was slowly removed and the skin sutured. Mice recovered for at least 2 months before analysis.

2.3. Experimental groups

Four mouse cohorts were analyzed (Supplemental Fig. 2). The number of mice analyzed is mentioned in each figure.

1. Homozygous 3xTg mice were injected at 6 months with AAV-GFP (3xTg-GFP mice) or AAV-SOCS3 + AAV-GFP at the same total viral titer (3xTg-SOCS3 mice), to block reactive astrocytes. AAV-GFP was co-injected with AAV-SOCS3 to visualize infected cells. Wild-type (WT) mice of the same age, gender, and genetic background were injected with AAV-GFP (WT-GFP) as control. Mice were tested on the elevated plus maze and the Y maze at 8 and 14–15 months. Mice were euthanized by an overdose of pentobarbital at the age of 16 months. The 2 brain hemispheres were rapidly dissected on ice. One was drop-fixed in 4% para-formaldehyde and used for immunohistochemistry. The other was cut into 1-mm thick slices on ice and the hippocampal GFP⁺ region was dissected out under a fluorescent macroscope, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until protein extraction.
2. At 3 months, WT mice were injected with AAV-GFP, and 3xTg mice were injected with AAV-GFP or with AAV-JAK2ca + AAV-GFP (same total viral titer, 3xTg-JAK2ca mice), to exacerbate astrocyte reaction. Mice were euthanized at the age of 16 months and analyzed by histological and biochemical approaches as described for the first cohort.
3. At 4 months, WT mice were injected with AAV-GFP, and 3xTg mice were injected with AAV-GFP or with AAV-SOCS3 + AAV-GFP. Mice were euthanized by an overdose of pentobarbital at the age of 9 months. The hippocampus was dissected out, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until protein extraction.
4. At 24 months, WT mice were injected with AAV-GFP, and 3xTg mice were injected with AAV-GFP or with AAV-SOCS3 + AAV-GFP. Mice were analyzed by biochemical approaches at 26 months as described for cohort 3.

The early and mid-stage cohorts (cohorts 1, 2, 3) were all injected at an early stage (3–6 months), when there is no detectable

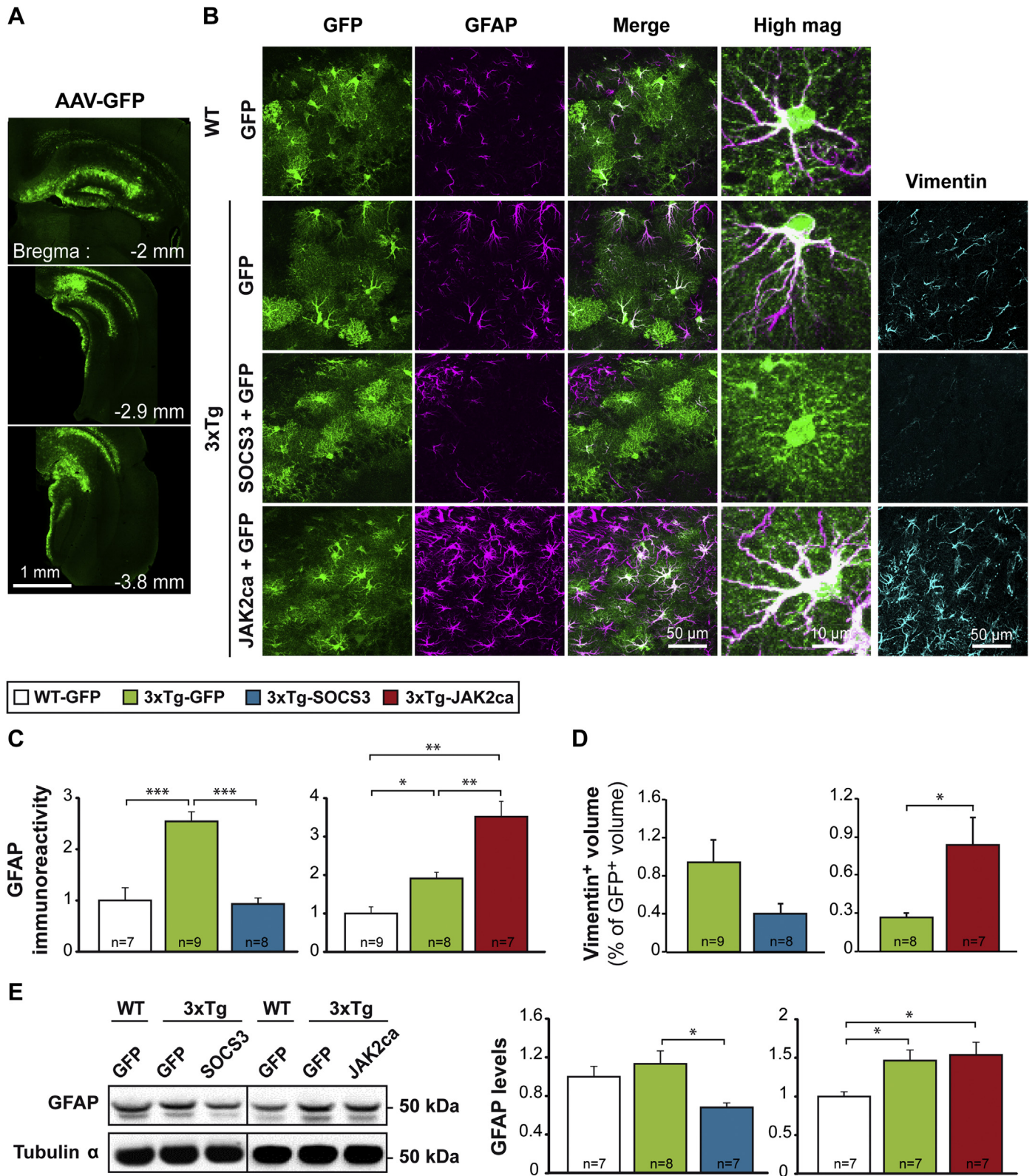


Fig. 1. Long-term modulation of reactive astrocytes by targeting the JAK2-STAT3 pathway in 3xTg mice. (A) Low magnification image of serial brain sections of a mouse injected with an AAV-GFP in CA1. GFP (green) is expressed throughout the dorsal hippocampus. (B) Confocal images of GFP⁺ astrocytes (green) stained for GFAP (magenta) or vimentin (cyan) in 16-month-old WT and 3xTg mice injected in the CA1 region with AAV-GFP, AAV-SOC3 + AAV-GFP, or AAV-JAK2ca + AAV-GFP (same viral titer). In 3xTg mice, astrocytes display the typical reactive features (GFAP overexpression and morphological changes). SOC3 significantly reduces GFAP levels (C) and tends to reduce vimentin levels (D), while JAK2ca increases both GFAP and vimentin levels. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. (E) Western blotting and quantification of GFAP levels (normalized to tubulin α) in WT-GFP, 3xTg-GFP, 3xTg-SOC3, and 3xTg-JAK2ca mice show the same pattern of GFAP modulation by SOC3 and JAK2ca. One-way ANOVA and Tukey's post hoc test [left graph: $F(2, 19) = 4.724$, * $p < 0.05$; right graph: $F(2, 18) = 5.267$, * $p < 0.05$]. Quantifications are expressed relatively to the WT group in each cohort, whose value was set to 1. Abbreviations: AAV, adeno-associated virus; ANOVA, analysis of variance; GFAP, glial fibrillary acidic protein; JAK2-STAT3, Janus kinase-signal transducer and activator of transcription 3; SOC3, suppressor of cytokine signaling 3; WT, wild type. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

amyloid or tau deposition (Carroll et al., 2010; Oddo et al., 2003). End-stage mice were injected at 24 months to assess whether a late manipulation of the JAK-STAT3 pathway in astrocytes could reverse or reduce advanced amyloid and tau pathology.

2.4. Immunohistology

Dedicated hemispheres were post-fixed for 24 hours in 4% paraformaldehyde, cryoprotected in a 30% sucrose solution, and cut on a freezing microtome into serial 30- μ m thick coronal sections. Series were stored at -20°C in an anti-freeze solution until used for immunostaining.

2.4.1. Immunofluorescence

Sections were rinsed in PBS for 3×10 minutes and blocked in 4.5% normal goat serum (NGS) diluted in PBS with 0.2% Triton X-100 (PBST) for 1 hour at room temperature (RT). Sections were incubated overnight at 4°C with anti-GFAP-Cy3 antibody (1:1000; Sigma, #C9205, Saint Louis, MO) diluted in 3% NGS/PBST. Sections were rinsed 3×10 minutes in PBS and incubated with secondary Alexa Fluor-conjugated antibodies (1:1000; Invitrogen, Carlsbad, CA) in 3% NGS/PBST for 1 hour at RT. After 3 washes in PBS, sections were incubated overnight at 4°C with an anti-GFP biotinylated antibody (1:500; Vector Laboratories, #BA-0702, Burlingame, CA) in 3% NGS/PBST. After 3 rinses in PBS, sections were incubated for 1 hour at RT with streptavidin-fluorescein isothiocyanate (1:1000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) in 3% NGS/PBST and rinsed 3 times with PBS before being mounted on SuperFrost Plus slides (Thermo Fisher Scientific) and coverslipped with Fluorsave medium (Calbiochem, Darmstadt, Germany). For Iba1 (1:500; Wako, #191974, Neuss, Germany) and vimentin (1:750; Abcam, #Ab24525, Cambridge, UK) staining, a standard protocol was performed as described above but endogenous GFP was not amplified and sections were incubated with 4',6 diamidino-2-phenylindole (1:2000; Invitrogen, #D21490) before being coverslipped with Vectashield medium (Vector Laboratories, #H1400). For methoxy-XO4 (MXO4; Tocris, Minneapolis, MN, USA) staining, sections were incubated with 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MXO4 in 0.1 M PBS for 30 minutes at RT under mild agitation. After 3 rinses with PBS, a standard protocol for immunofluorescence was performed as described above. For A β staining with the 4G8 antibody (1:500; Covance, #SIG39240, Princeton, NJ, USA), sections were treated with 70% formic acid for 2 minutes before incubation with primary biotinylated 4G8 antibody for 48 hours at 4°C . After 3 rinses with PBS, sections were incubated for 1 hour at RT with streptavidin-Cy3 (1:1000; Sigma) in 3.5% NGS/PBST. Sections were then mounted as previously described.

2.4.2. Immunohistochemistry

Sections were rinsed in PBS for 3×10 minutes and incubated with H_2O_2 (1:100; Sigma) for 20 minutes at RT to inhibit peroxidases. For HT7 antibody, sections were pre-treated with 10 mM citrate buffer for 20 minutes at 90°C before H_2O_2 treatment. Sections were then blocked in 4.5% NGS/PBST for 1 hour at RT and incubated overnight at RT or 48 hours at 4°C in 3% NGS/PBST with the following primary antibodies: anti-A β 42 (1:500, Rabbit; Life Technologies, #44-344, Carlsbad, CA, USA), AT8 (1:400, Mouse; Thermo Fisher Scientific, #MN1020 B), HT7 (1:1000, Mouse; Innogenetics, #90204, Zwijnaarde, Belgium), anti-phospho-Ser422-Tau (1:400, Rabbit; Abcam, #Ab79415). After 3×10 minutes rinses in PBS, sections were incubated for 1 hour at RT with biotinylated secondary antibodies (1:4000, except at 1:1000 for anti-phospho-Ser422-tau; Vector Laboratories) in 3% NGS/PBST. They were washed 3×10 minutes and incubated for 1 hour at RT with avidin/biotin complexes (1:250 in PBST; Vector Laboratories) and after 3 washes with PBS, incubated with VIP (Vector Laboratories). Sections were mounted on

SuperFrost Plus slides and dried overnight at RT. Sections were dehydrated in acetone and xylene and coverslipped with Eukitt mounting medium (Chem-Lab, Zedelgem, Belgium).

2.5. Immunostaining quantification

GFAP staining was quantified on $10\times$ -tiled images of serial brain sections (240 μm between each sections), acquired with an epifluorescence microscope (BM6000B; Leica, Nussloch, Germany). Virtually transduced GFP $^{+}$ regions were manually segmented on each section and the GFAP mean gray value was measured in this GFP $^{+}$ region with ImageJ. Vimentin was quantified on $10\times$ -tiled images taken from another series of brain sections, acquired with the epifluorescence microscope. An intensity threshold was applied and the area of immunopositive pixels within the manually segmented GFP $^{+}$ region was automatically extracted on each section. The Vimentin $^{+}$ volume was calculated by the Cavalieri method (West and Gundersen, 1990) (volume = $t \times \Sigma$ area; where t is the distance between two 2-sampled sections, here 240 μm). It was then normalized to the total GFP $^{+}$ volume, calculated by the same method. Representative fluorescent images in Fig. 1 and Supplemental Fig. 1 were acquired with a $40\times$ objective on a confocal microscope (TCS SP8; Leica).

The number of Iba1 positive cells around each plaque was quantified by scanning the section across its z-axis, under the $40\times$ objective of the confocal microscope. An image was acquired at the center of the plaque to measure its cross-sectional area. In each mouse brain, 6–26 plaques within the GFP $^{+}$ hippocampal region were sampled. They were taken from at least 3 fields of view from different sections.

Serial sections stained for HT7, phospho-Ser422-tau, or AT8 were scanned under bright light, with an Axio scanZ.1 (Zeiss, Oberkochen, Germany) to cover the entire anteroposterior axis of the hippocampus. The immunopositive area within the manually segmented hippocampus was automatically detected on each section, with an intensity threshold applied with ImageJ. The immunopositive volume was calculated by the Cavalieri method, normalized to the total volume of the hippocampus, calculated by the same method and expressed as a percentage. Hippocampal volume was not different between groups (data not shown).

The number and surface of all MXO4-labeled plaques were quantified on $10\times$ -tiled fluorescent images of a series of slices covering the anteroposterior axis of the hippocampus, acquired on the Leica epifluorescence microscope. A β 42 plaques were quantified on immunostained sections scanned under bright field on the Axio scan. Automatic detection of objects according to intensity and size thresholds was performed on these images, after manual segmentation of the hippocampus on each section, with ImageJ. To quantify 4G8 immunoreactivity, the subiculum and stratum pyramidale of the CA1 region were manually segmented on $10\times$ -tiled fluorescent images of a series of slices covering the anteroposterior axis of the hippocampus and the mean gray value was measured with ImageJ. Investigators were partially blinded to the group when analyzing immunostained sections, as the group can be deduced based on the presence of amyloid or tau staining or GFP levels for example.

2.6. Protein extraction

Hippocampal samples were homogenized by sonication (Labor-technik, Wasserburg, Germany; 6 strokes with cycle = 0.5, 30% amplitude) in lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH = 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 with 1:100 phosphatase inhibitors (Sigma, cocktail 2) and 1 $\times$ protease inhibitors (Roche, Basel, Switzerland)] and centrifuged at 20,000 g for 20 minutes at 4°C . The supernatant contains Triton X-100 soluble proteins and was used for western blotting and Meso Scale Discovery (MSD) enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA) tests. Protein concentration was measured by the bicinchoninic acid assay (Pierce, Waltham, MA, USA).

2.7. Western blot

Samples were diluted in loading buffer with Dithiothreitol (NuPAGE LDS sample buffer and sample reducing agent; Invitrogen). Ten micrograms of proteins were loaded on a NuPAGE 4%–12% Bis-Tris Midi Gel (Life Technologies) and exposed to 200 V for 45 minutes in NuPAGE Running Buffer (Invitrogen). Proteins were transferred on a nitrocellulose membrane with an iBlot Gel transfer device (Invitrogen). After 3×10 minutes rinses in Tris buffer saline and 0.1% Tween 20 (TBST), membranes were blocked in 5% milk in TBST for 1 hour at RT and incubated for 3 hours at RT, or overnight at 4 °C with the following primary antibodies: 6E10 (1:500, Mouse; Covance, #SIG-39320-20), anti-ApoE (1:1000, Rabbit; Abcam, #Ab20874), anti-BACE1 (1:1000, Rabbit; Cell Signaling, #5606P, Danvers, MA, USA), anti-GFAP (1:5000, Rabbit; Dako, #Z0334, Troy, MI), anti-IDE (1:400, Rabbit; Abcam, #Ab32216), anti-phospho-Ser404-Tau (1:1000, Rabbit; Sigma, #T7444), and anti-Tubulin α (1:1000, Mouse; Sigma, #T5168). After 3×10 minutes washes in TBST, membranes were incubated for 1 hour at RT with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:5000; Vector laboratories) diluted in TBST with 5% milk. Membranes were incubated with the Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and the signal was detected with a Fusion FX7 camera (Thermo Fisher Scientific). Band intensity was quantified with ImageJ and normalized to Tubulin α . Each antibody was used on at least 2 different membranes. Representative images and quantification are shown.

2.8. MSD ELISA tests

Triton X-100 soluble proteins were diluted in the diluent provided for the V-PLEX A β peptide panel kit (A β 38, A β 40, A β 42, 6E10 antibody; MSD, Rockville, MD). For the phospho-Thr231-tau/total tau kit (MSD), samples were diluted in 20 mM Tris-HCl pH = 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM ethylene diamine tetraacetic acid, 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid, 1% Triton X-100, with phosphatase and protease inhibitors. For both assays, samples were loaded in triplicate and the manufacturer's protocol was followed. Peptide levels were quantified with a standard curve, using the Discovery Workbench 4.0, MSD software, and normalized to the protein content in each well.

2.9. Behavioral analysis

WT-GFP, 3xTg-GFP, and 3xTg-SOCS3 mice were tested at the age of 8 and 14–15 months on the elevated plus maze to evaluate anxiety and after 1 month on the Y maze to assess working spatial memory. All tests were performed between 8 AM and noon. Mice were handled daily for 2 minutes for 5 days before the first training session. Both mazes were cleaned with 10% ethanol and carefully dried between each phase and each mouse to remove odors. Investigators were blinded to the group when performing experiments.

The elevated plus maze test was formed by 4 connected arms placed 50 cm above the ground, illuminated at 100 lux in the center (Fig. 6B). Two arms made of black Plexiglas were closed (non-stressful arms) while the 2 others were open (stressful arms). Each mouse was placed in the center of the maze and video-tracked for 5 minutes with the EthoVision XT11.5 software (Noldus IT, The Netherlands). The following parameters were measured: distance traveled and time spent in each arm, frequency of entry into each arm, duration, and number of head dipping (counted manually

during the experiment). Mice performing fewer than 4 entries into different arms were excluded from the analysis.

The Y maze test was composed of 3 arms in black Plexiglas, illuminated at 110 lux in the center. Each mouse was placed at the extremity of the “start arm” and left for a training session of 15 minutes, with one of the 2 other arms closed with a black Plexiglas door (the closed arm was randomly chosen for each mouse). Then, the mouse was brought back to its cage for 5 minutes, the maze was cleaned, the closed arm was opened, and the mouse placed at the extremity of the start arm for a 5-minute test session, under videotracking (Fig. 6A). The distance traveled and time spent in each arm (start, familiar, and novel arms) were measured and analyzed with EthoVision. Given their natural curiosity, mice are expected to spend more time exploring the new arm. Mice that stayed in the start arm during training or made less than 4 total entries in the 3 arms during testing were excluded.

2.10. Statistical analysis

Results are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. Statistical analysis was performed with Statistica software (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Student's *t*-test and one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post hoc test were used to compare 2 and 3 groups, respectively. Two-way (group, arm) ANOVA followed by Tukey's post hoc test was used for Y maze analysis. For each analysis, normality of variables or residues and homoscedasticity were assessed. If any or both conditions of application were not fulfilled, non-parametric tests were used. Two groups were compared by the Mann-Whitney test and 3 independent groups were compared by a Kruskal-Wallis test followed by a Mann-Whitney test. The significance level was set at $p < 0.05$. The number of analyzed mice per group is indicated in each bar histogram.

3. Results

3.1. The JAK2-STAT3 pathway efficiently controls reactive features of hippocampal astrocytes in 3xTg mice

We previously showed that adeno-associated viral (AAV) gene transfer of SOCS3, an inhibitor of the JAK-STAT3 pathway, in hippocampal astrocytes, prevents their acquisition of reactive molecular features, including in 9 and 12-month-old 3xTg mice (Ben Haim et al., 2015a,b; Ceyzeriat et al., 2018). We studied whether SOCS3 was still able to block reactive astrocytes at a later stage, when both tau and amyloid pathologies are present in 16-month-old 3xTg mice.

Six-month-old female 3xTg mice were injected with an AAV2/9 vector encoding *Socs3* under the *gfaABC1D* promoter (3xTg-SOCS3 mice). This viral vector allows the selective transduction of astrocytes, in the dorsal hippocampus (Fig. 1A, Supplemental Fig. 1), covering 25% of the whole hippocampus. WT and 3xTg mice were injected with an AAV encoding GFP as control (WT-GFP and 3xTg-GFP mice respectively; see Supplemental Fig. 2). Brain sections from 16-month-old 3xTg-GFP mice displayed 3-fold higher GFAP levels than WT-GFP mice (Fig. 1B and C). In 3xTg-GFP mice, hippocampal astrocytes appear hypertrophic, a typical hallmark of reactive astrocytes. AAV gene transfer of SOCS3 in astrocytes reduced GFAP levels and normalized astrocyte morphology (Fig. 1B and C).

Mirror experiments were performed on another mouse cohort to further activate astrocytes by stimulation of the JAK2-STAT3 pathway. Three-month-old female 3xTg mice were injected in the hippocampus with an AAV encoding a constitutively active form of JAK2 (JAK2ca), the upstream kinase of the JAK2-STAT3 pathway, and were studied at 16 months (3xTg-JAK2ca mice). Control groups included WT-GFP and 3xTg-GFP mice injected and analyzed at the same age (Supplemental Fig. 2). 3xTg-JAK2ca mice displayed

enhanced astrocyte reaction, visible as a 2-fold increase in GFAP immunoreactivity and exacerbated enlargement and tortuosity of astrocyte processes, compared with 3xTg-GFP mice (Fig. 1B and C). Modulation of GFAP levels by SOCS3 and JAK2ca was also observed by western blotting on hippocampal samples taken from WT-GFP, 3xTg-GFP, 3xTg-SOCS3, and 3xTg-JAK2ca mice (Fig. 1E). The immunoreactivity for vimentin, another intermediate filament characteristic of reactive astrocytes, was also reduced by more than 50% by SOCS3 in the hippocampus of 3xTg mice, although it did not reach significance (Fig. 1B and D). Conversely, vimentin immunoreactivity was increased more than 3-fold by JAK2ca (Fig. 1B and D). The number of microglia cells in direct contact with amyloid plaques was not impacted by either SOCS3 or JAK2ca in 3xTg-AD mice (Fig. 2A and B), suggesting that our strategy modulates reactive astrocytes without significantly impacting microglial cells around plaques, as reported in another mouse model of AD (Ceyzeriat et al., 2018).

These results show that manipulation of the JAK2-STAT3 pathway in hippocampal astrocytes is an efficient strategy to modulate the reactive state of astrocytes in 3xTg mice. We next evaluated how manipulation of reactive astrocytes by SOCS3 and JAK2ca impacted tau hyper-phosphorylation and amyloid deposition, 2 cardinal features of AD.

3.2. Modulation of reactive astrocytes does not influence tau phosphorylation in 3xTg mice

At the age of 16 months, 3xTg mice display both tau and amyloid pathologies. Tau can be phosphorylated on multiple epitopes. Three

main approaches were used to characterize the effects of reactive astrocytes on tau phosphorylation: (1) immunostainings with antibodies against phospho-Ser422-tau, phospho-Ser202/Thr205-tau (AT8 antibody), and total human tau (HT7 antibody) as a control, (2) ELISA MSD assay with antibodies against phospho-Thr231-tau (AT180 antibody) and total tau, and (3) western blotting against phospho-Ser404-tau.

Positive staining for HT7, phospho-Ser422-tau, and AT8 was observed in 3xTg mice but not in WT mice (Fig. 3A). HT7 immunoreactivity was not changed by SOCS3 or JAK2ca in the hippocampus of 3xTg mice (Fig. 3A and B), suggesting that the expression of the human tau transgene is not impacted by our experimental manipulations. Immunostaining with phospho-Ser422-tau and AT8 antibodies revealed dystrophic neurons and numerous ghost tangles in the hippocampus (Fig. 3A). Immunoreactivity for these 2 antibodies was similar between the 3xTg-GFP, 3xTg-SOCS3, and 3xTg-JAK2ca groups (Fig. 3B), suggesting that modulation of reactive astrocytes through the JAK2-STAT3 pathway does not impact the level of phosphorylation of these epitopes.

We next measured hippocampal concentrations of phospho-Thr231-tau and total human tau by MSD assays on protein homogenates prepared from the hippocampus of 3xTg-GFP, 3xTg-SOCS3, or 3xTg-JAK2ca. Levels of phospho-Thr231-tau normalized by total tau and total tau were not impacted by SOCS3 or JAK2ca in 16-month-old 3xTg mice (Fig. 3C). To assess whether reactive astrocytes impact tau phosphorylation at a later stage of the disease, we performed the same measurement in 26-month-old female 3xTg mice that were injected 2 months before, with AAV-GFP or AAV-SOCS3. Tau phosphorylation on Thr231 was also unaffected by SOCS3 in 26-month-old 3xTg mice (Fig. 3D).

Finally, we analyzed phospho-Ser404-tau levels by western blotting on hippocampal protein samples from 16-month-old 3xTg-GFP, 3xTg-SOCS3, and 3xTg-JAK2ca. We found no difference between groups (Supplemental Fig. 3).

Our results show that JAK2-STAT3 pathway modulation of reactive astrocytes in 3xTg mice does not influence tau phosphorylation on several epitopes, at advanced and terminal stages of the disease.

3.3. Modulation of reactive astrocytes does not impact amyloid deposition in 3xTg mice

Amyloid pathology was assessed by 4 approaches: (1) fluorescent staining with the Congo-red derivative MXO4 that binds dense-core amyloid plaques of different size, (2) immunostaining with the A β 42 antibody that labels small dense-core plaques (Serrano-Pozo et al., 2011), (3) immunofluorescent staining with the 4G8 antibody that labels diffuse plaques, as well as intracellular A β , which is prominent in 3xTg mice (Oddo et al., 2003), and finally (4) MSD measurement of Triton X100-soluble A β levels in hippocampal homogenates.

In 16-month-old 3xTg mice, numerous MXO4⁺ plaques were found in the *subiculum* and CA1 region of the hippocampus (Fig. 4A). Modulation of reactive astrocytes by SOCS3 or JAK2ca had no detectable impact on hippocampal amyloid plaques stained by MXO4 (Fig. 4A). Detection of amyloid plaques by immunostaining with the A β 42 antibody also showed no difference in their number between the 3 groups (Supplemental Fig. 4). The average individual size of MXO4⁺ or A β 42⁺ plaques was identical between groups (Fig. 4B and C and Supplemental Fig. 4, respectively). Similarly, immunoreactivity in the *subiculum* and pyramidal layer of the CA1 region for intracellular A β labeled by the 4G8 antibody was identical between groups (Supplemental Fig. 4).

We next measured Triton X-100 soluble A β levels by MSD assays on protein homogenates prepared from the hippocampus of 3xTg-GFP, 3xTg-SOCS3, or 3xTg-JAK2ca mice. At the age of 16 months,

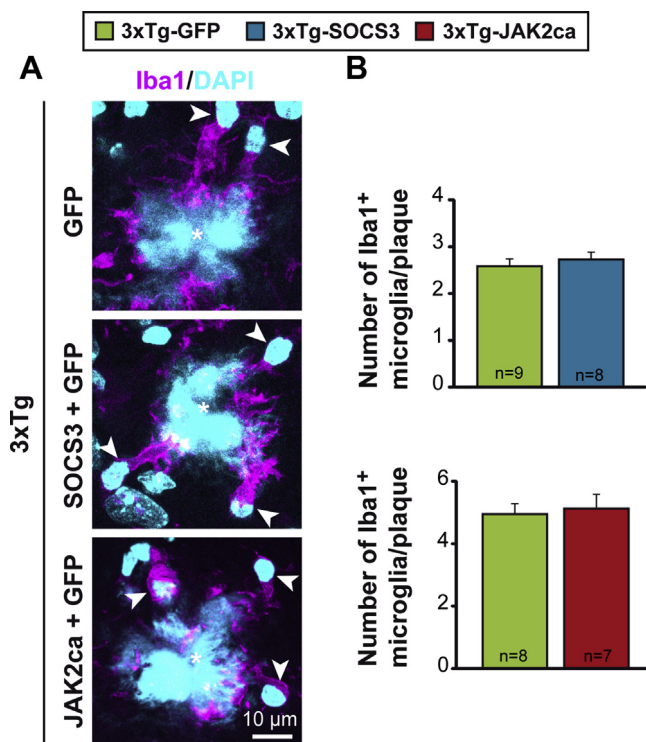


Fig. 2. Modulation of reactive astrocytes does not impact the number of microglial cells around plaques in 3xTg mice. (A) Representative confocal image of Iba1⁺ microglia cells (magenta, arrowhead) around amyloid plaque (cyan, star) in 16-month-old 3xTg-GFP, 3xTg-SOCS3, and 3xTg-JAK2ca mice. Nuclei and amyloid plaques are labeled with DAPI (cyan). (B) Quantification of the number of Iba1⁺ cells per plaque shows no difference between groups. Student's *t*-test [upper graph: *t* (15) = −0.495, *p* = 0.628; lower graph: *t* (13) = −0.320, *p* = 0.754]. Abbreviations: JAK2-STAT3, Janus kinase-signal transducer and activator of transcription 3; SOCS3, suppressor of cytokine signaling 3. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

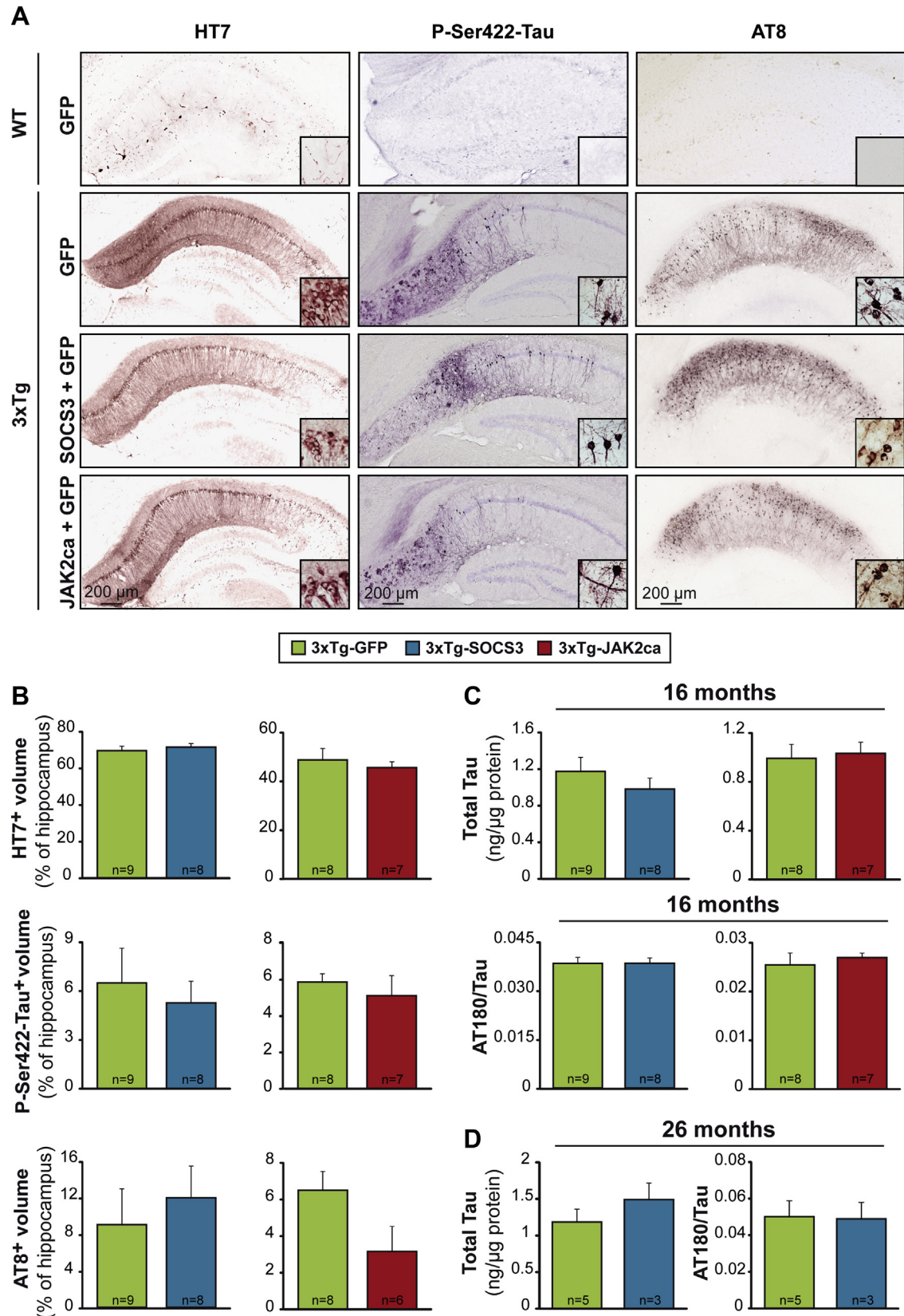


Fig. 3. Modulation of reactive astrocytes does not impact tau pathology in 3xTg mice. (A) Representative brain sections of 16-month-old WT, 3xTg-GFP, 3xTg-SOCS3, and 3xTg-JAK2ca mice stained with antibodies against total human tau (HT7), phospho-Ser422-tau (P-Ser422-Tau), or phospho-Ser202/Thr205-tau (AT8). High magnification images for each staining shows dystrophic neurons and ghost tangles in 3xTg mice. (B) Quantification of the immunopositive volume in the whole hippocampus shows no difference between groups for these 3 antibodies. Student's *t*-test [AT8 left graph: $t(15) = -0.558$, $p = 0.585$; AT8 right graph: $t(12) = 2.001$, $p = 0.069$] or Mann-Whitney test (HT7, P-Ser422-Tau). (C) MSD measurement of phospho-Thr231-tau (AT180 antibody) and total tau in protein homogenates prepared from the hippocampus of 16-month-old 3xTg-GFP, 3xTg-SOCS3, and 3xTg-JAK2ca mice. Total tau and AT180/Tau levels are not impacted by SOCS3 or JAK2ca in 3xTg mice. Mann-Whitney test. (D) The same measurement in 26-month-old 3xTg-GFP and 3xTg-SOCS3 mice shows that total tau and AT180/tau levels are similar in both groups. Mann-Whitney test. Abbreviations: JAK2-STAT3, Janus kinase-signal transducer and activator of transcription 3; SOCS3, suppressor of cytokine signaling 3; WT, wild type. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

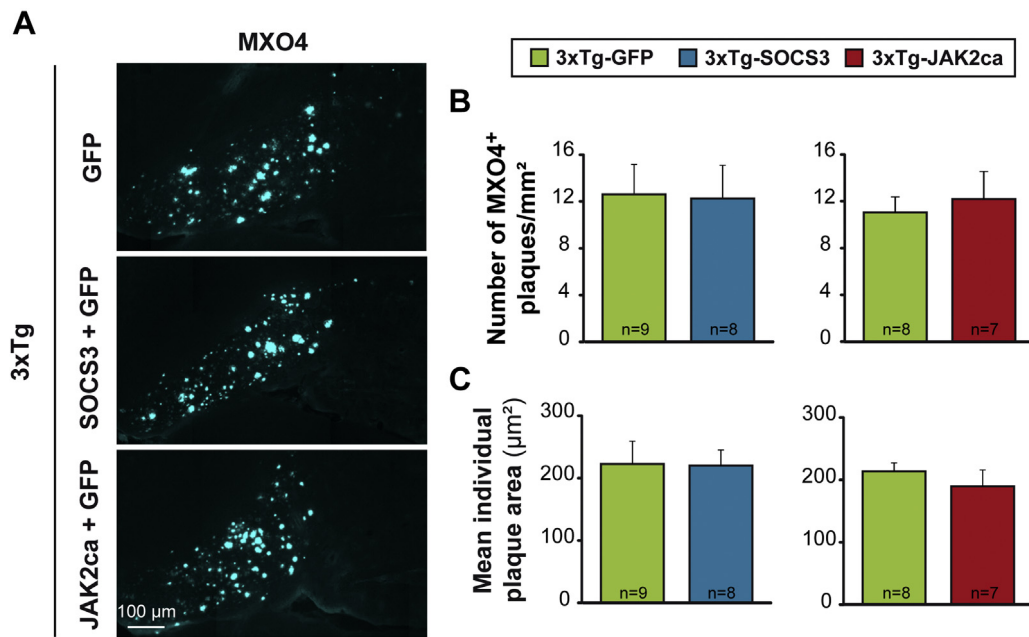


Fig. 4. Modulation of reactive astrocytes does not impact amyloid load in 16-month-old 3xTg mice. (A) Representative images of amyloid plaques labeled with MXO4 (cyan) in 16-month-old 3xTg-GFP, 3xTg-SOCS3, and 3xTg-JAK2ca mice. (B) Quantification of the total number of MXO4⁺ plaques in the whole hippocampus shows no difference between groups. Mann-Whitney test. (C) The mean size of individual MXO4⁺ amyloid plaques is also similar between groups. Mann-Whitney test. Abbreviations: JAK2-STAT3, Janus kinase-signal transducer and activator of transcription 3; MXO4, methoxy-XO4; SOCS3, suppressor of cytokine signaling 3. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

only A β 42 was reliably detected and quantified (A β 40 was undetectable in 2–4 mice in each group, corresponding to 30% of the 2 cohorts). Hippocampal A β 42 concentrations were not significantly modified by SOCS3 or JAK2ca (Fig. 5A). Accordingly, several proteins

involved in APP metabolism were found at similar levels in 16-month-old 3xTg-GFP, 3xTg-SOCS3, and 3xTg-JAK2ca mice [APP; BACE1, the β -secretase that cleaves APP through the amyloidogenic pathway; insulin degrading enzyme that degrades A β ; and

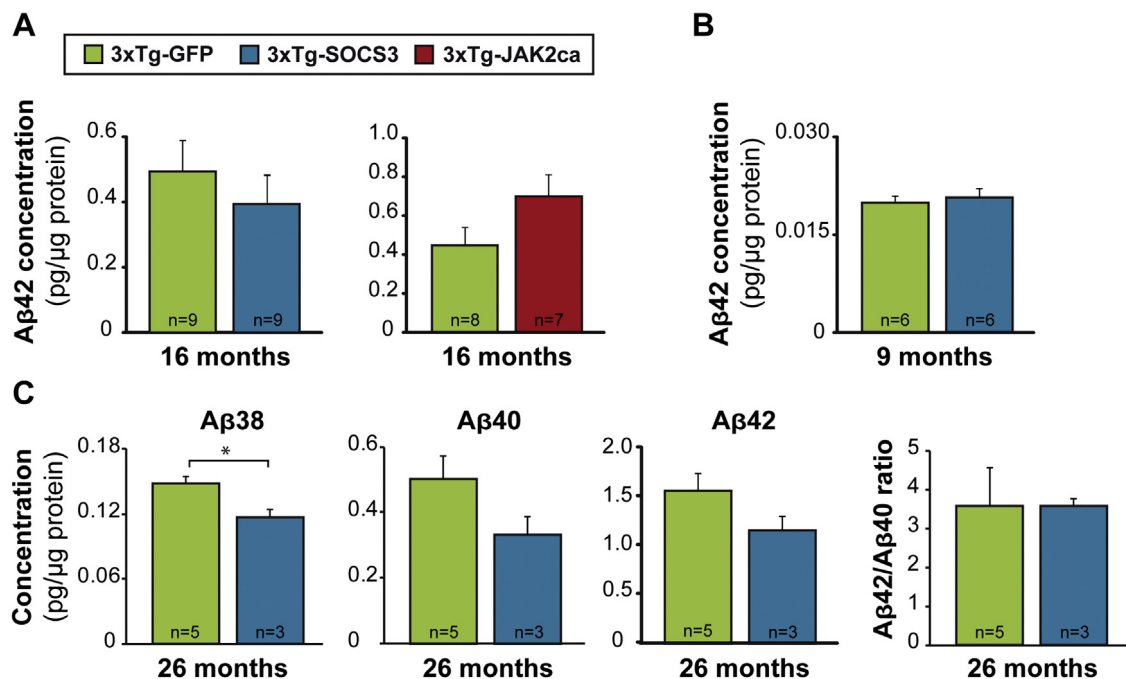


Fig. 5. Modulation of reactive astrocytes does not impact soluble A β levels in 3xTg mice. MSD measurement of A β 42 concentration in Triton-X100 soluble protein homogenates prepared from the hippocampus of 16-month-old 3xTg-GFP, 3xTg-SOCS3, and 3xTg-JAK2ca mice (A), or in 3xTg-GFP and 3xTg-SOCS3 mice at the age of 9 (B) and 26 (C) months. A β 42 levels increase with age, but are not changed by SOCS3 or JAK2ca in 3xTg mice. (C) A β 40 levels, A β 42/40 ratio are similar in 3xTg-GFP and 3xTg-SOCS3 groups, while A β 38 levels are significantly reduced by SOCS3 in end-stage 26-month-old 3xTg mice. * p < 0.05. Mann-Whitney test. Abbreviations: JAK2-STAT3, Janus kinase-signal transducer and activator of transcription 3; SOCS3, suppressor of cytokine signaling 3. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

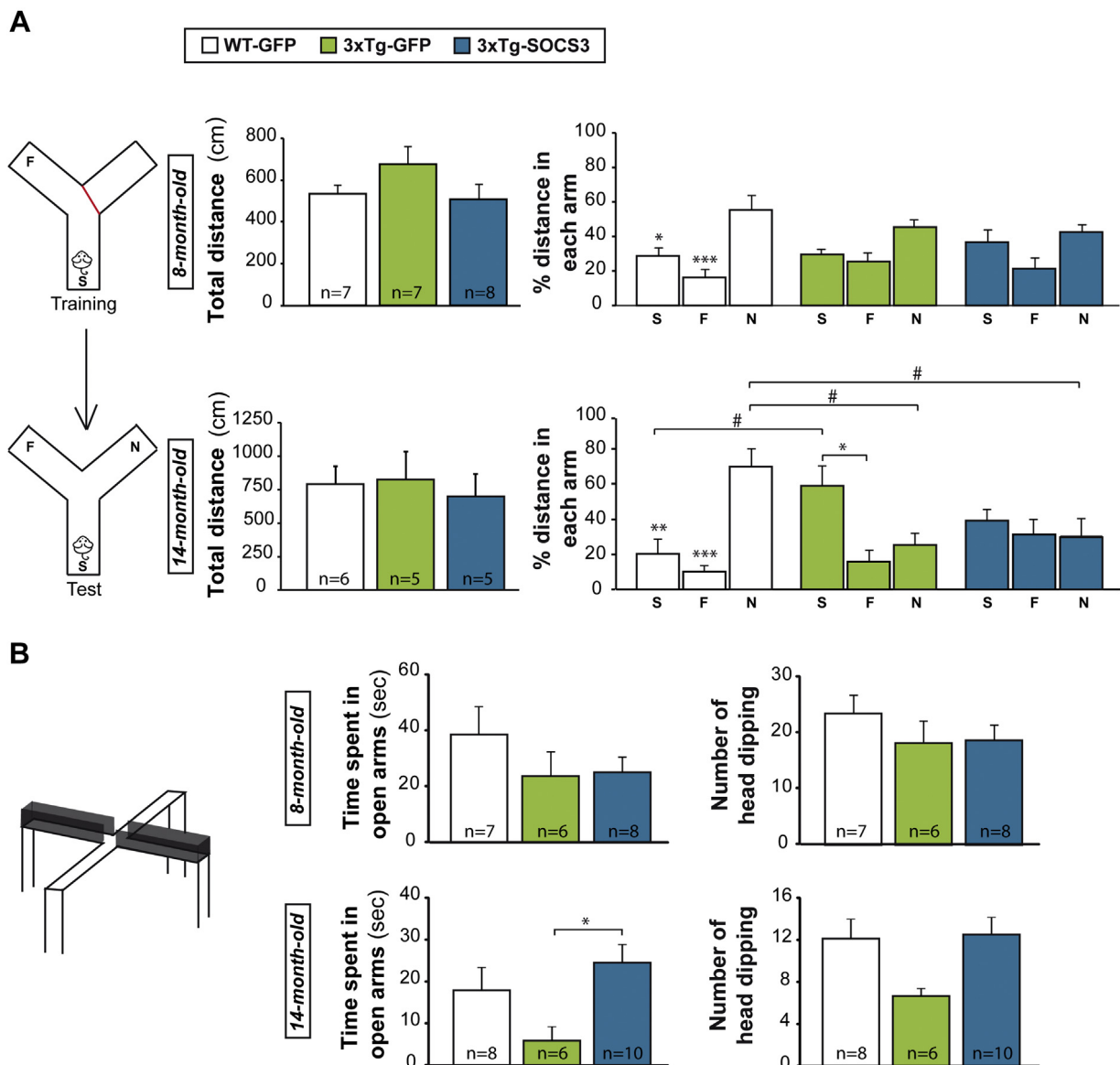


Fig. 6. SOCS3-inhibition of reactive astrocytes does not correct memory deficits but reduces anxiety in 3xTg mice at 14 months. (A) The total distance traveled during the test phase of the Y maze is not different between the 3 groups, at both 8 and 14 months [8 months: $F(2, 19) = 1.789$, $p = 0.194$; 14 months: $F(2, 13) = 0.156$, $p = 0.857$]. At 8 months, WT-GFP mice preferentially explore the novel arm (N) over the start (S) or the familiar arm (F). In contrast, 3xTg-GFP and 3xTg-SOCS3 show no preference for the novel arm, reflecting an altered working memory. Similarly, at 14 months, WT-GFP mice still explore preferentially the novel arm while 3xTg-GFP mice show no preference for the novel arm. They traveled significantly more distance in the start arm than WT-GFP mice, suggesting increased anxiety. Interestingly, 3xTg-SOCS3 mice do not stay within the start arm and explore all arms similarly, suggesting that SOCS3 reduces mouse anxiety but does not correct short-term memory. Two-way (group, arm) ANOVA and Tukey post hoc test [8 months: arm effect: $F(2, 57) = 17.444$, $p < 0.001$, group $\times$ arm interaction: $F(4, 57) = 1.3734$, $p = 0.254$; 14 months: arm effect: $F(2, 39) = 6.724$, $p < 0.01$, group $\times$ arm interaction: $F(4, 39) = 8.220$, $p < 0.001$]. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (between arms, within the same group), # $p < 0.05$ (between groups, for the same arm). (B) At 8 months, the 3 mouse groups explore similarly the open arm on the elevated plus maze test. Kruskal-Wallis test. At 14 months, 3xTg-GFP mice tend to spend less time and perform less head dipping in open arms than WT-GFP mice. SOCS3 expression in hippocampal astrocytes significantly increases the time spent in open arms. Time in open arm: ANOVA and Tukey post-hoc test, $F(2, 21) = 3.702$, * $p < 0.05$. Head dipping: Kruskal-Wallis test. Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; SOCS3, suppressor of cytokine signaling 3; WT, wild type. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

apolipoprotein E (ApoE), a protein secreted by astrocytes, which binds and clears cholesterol and A β (Supplemental Fig. 5)].

To study whether reactive astrocytes impact A β levels at an earlier or later stage of the disease, we performed the same measurement of A β levels in 9-month-old and 26-month-old female 3xTg-GFP and 3xTg-SOCS3 mice. Again, A β 42 concentrations were identical between groups at both ages and A β 38 and A β 40 only reached detectable levels in 26-month-old 3xTg mice (Fig. 5B and C). The A β 42/A β 40 ratio was not impacted by SOCS3 but concentrations of A β 38, the least toxic form (Li et al., 2018), were significantly decreased by SOCS3 (Fig. 5C).

Overall, our analysis demonstrates that JAK2-STAT3-dependent reactive astrocytes do not overtly contribute to amyloid metabolism and deposition in 3xTg mice, at 3 different disease stages.

3.4. Inhibition of reactive astrocytes improves anxiety but not memory in 3xTg mice

We previously showed that hippocampal reactive astrocytes contribute to deficits in synaptic transmission and plasticity in 9-month-old 3xTg mice (Ceyzeriat et al., 2018). Here, we analyzed

whether synaptic restoration by SOCS3 translates into cognitive improvement in 3xTg mice.

We tested whether SOCS3-mediated inhibition of reactive astrocytes improved spatial memory deficits on the Y maze (Carroll et al., 2007) and anxiety on the elevated plus maze (Blanchard et al., 2010). WT-GFP, 3xTg-GFP mice, and 3xTg-SOCS3 were first tested at 8 months. Each mouse was placed on the Y maze to explore 2 arms (the start and familiar arms, one being closed) for 15 minutes of training (Fig. 6A). After 5 minutes in their home cage, the mouse was placed again in the start arm of the maze with the 3 arms opened. In average, WT-GFP, 3xTg-GFP, and 3xTg-SOCS3 mice traveled the same total distance during the test session, showing equivalent exploration (Fig. 6A). However, they explored the 3 arms differently ($p < 0.001$ for arm effect, 2-way ANOVA; Fig. 6A). WT-GFP mice displayed the expected preference for the novel arm during the test session. On the contrary, 3xTg-GFP and 3xTg-SOCS3 mice did not discriminate the new arm from the 2 other arms, revealing an alteration in working memory (Fig. 6A). These mice were also tested on the elevated plus maze. The time spent in the open arms of the maze was used as a surrogate for the level of anxiety. All 3 groups explored similarly the open arms, suggesting that 3xTg mice did not display higher anxiety at this age (Fig. 6B).

These mice were tested again at the age of 14 months. At this later stage, WT-GFP mice displayed an even stronger preference for the new arm on the test phase (Fig. 6A; $p < 0.001$ for group $\times$ arm effect, 2-way ANOVA), whereas 3xTg-GFP mice explored significantly more the start arm than the novel and familiar arms (Fig. 6A). This lack of preference for the novel arm confirms the alteration in working memory, while the preference for the start arm suggests increased anxiety to explore more distant arms. SOCS3 did not improve working spatial memory in 3xTg mice, but it reduced their anxiety, as they did not remain in the start arm and explored the 3 arms similarly (Fig. 6A).

On the elevated plus maze, 3xTg-GFP mice tended to spend less time and to perform less head dipping in open arms, an indication of higher anxiety. SOCS3 reduced anxiety in 3xTg mice, by significantly increasing the time spent in the stressful open arms (Fig. 6B).

Our data show that inhibition of reactive astrocytes by SOCS3 does not alleviate memory deficits in 3xTg mice but reduces anxiety levels.

4. Discussion

Our multi-level preclinical analysis shows that modulation of hippocampal reactive astrocytes through the JAK2-STAT3 pathway does not significantly impact tau or amyloid pathologies, at different stages in 3xTg-AD mice. However, SOCS3-mediated inhibition of reactive astrocytes reduced their anxiety, without restoring short-term spatial memory.

4.1. The JAK2-STAT3 pathway and reactive astrocytes

This study further demonstrates the central role played by the JAK2-STAT3 pathway in the control of reactive astrocytes as previously reported in other mouse models of neurodegenerative diseases (Ben Haim et al., 2015a,b; Ceyzeriat et al., 2018; Reichenbach et al., 2019) and other diseases like ischemia, spinal cord injury, or trauma (see Ceyzeriat et al., 2016 for review). Strikingly, we found that expression of SOCS3 or JAK2ca in astrocytes was able to respectively inhibit or exacerbate GFAP expression and morphological changes in hippocampal reactive astrocytes of 3xTg mice. These effects are extremely stable (observed after >10 months post-injection) and allow analysis of reactive astrocytes at different disease stages. Previously, we have shown that, besides these 2 hallmarks, SOCS3 was also able to normalize the transcriptome of

reactive astrocytes in neurodegenerative disease models (Ben Haim et al., 2015a,b; Ceyzeriat et al., 2018). It would be interesting to explore the molecular profile of astrocytes in 3xTg-GFP and 3xTg-SOCS3 mice as well, to assess whether the same genes are dysregulated in these 2 AD models, and whether they are normalized by SOCS3. Similar reduction in reactive gene levels was found with the conditional knock-out of STAT3 in astrocytes in APP/PS1dE9 mice (Reichenbach et al., 2019) and mice with spinal cord injury (Anderson et al., 2016). Thus, activation of the JAK2-STAT3 pathway is necessary for both the induction and persistence of several molecular and morphological features of reactive astrocytes, identifying this cascade as a master regulator of astrocyte reaction in disease.

4.2. Reactive astrocytes do not influence molecular hallmarks of AD in 3xTg mice

We show that JAK2-STAT3-dependent reactive astrocytes do not significantly impact tau and amyloid pathologies. This was observed at 3 different stages of the disease (9, 16, and 24 months), ruling out stage-dependent effects. We found that 30% of 3xTg mice did not display detectable A β 40 levels at 16 months. In the brain of 3xTg mice, A β 40 levels are either reported to be higher than those of A β 42 (Hirata-Fukae et al., 2008), equivalent (Oddo et al., 2003), or lower (Goni et al., 2013). A β 40 levels are probably dependent on the exact brain region analyzed and the mouse age, as well as the extraction protocol and detection method. A β 40 was readily detected in 26-month-old mice but its levels remained lower than those of A β 42. We only found a significant reduction in A β 38 levels in the hippocampus of end-stage 3xTg-SOCS3 mice. A β 40 and A β 42 tended to be reduced in this group as well, but it did not reach significance. It is possible that a higher number of mice per group would lead to significant differences between groups but nonetheless, the effects would remain small (20%–30% range). A β 38 was shown to be less synaptotoxic than A β 40 or A β 42 (Li et al., 2018), suggesting that such an end-stage and marginal reduction in A β 38 levels may not significantly alleviate neuronal dysfunctions. Therefore, JAK2-STAT3-dependent reactive astrocytes have only a minor role in amyloid processing in this model.

The lack of SOCS3 effects on amyloid deposition is in contrast with our previous study reporting a significantly reduced number of MXO4⁺ amyloid plaques in APP/PS1dE9 mice with the same AAV-SOCS3 (Ceyzeriat et al., 2018). This AAV also infected 25% of hippocampal astrocytes in these mice, showing that even a partial inhibition of reactive astrocytes in the hippocampus is able to impact amyloid deposition. The present result is also in opposition with 2 studies reporting lower amyloid deposition after inhibition of reactive astrocytes through the calcineurin-nuclear factor of activated T-cells pathway (Furman et al., 2012; Sompol et al., 2017) or after STAT3 conditional knockout in astrocytes of APP/PS1dE9 mice (Reichenbach et al., 2019). However, these 2 strategies to interfere with reactive astrocytes could impact a different set of astrocyte molecular and functional features than SOCS3 expression, leading to different effects on amyloid deposition. The fact that the same experimental manipulation of reactive astrocytes (through the JAK2-STAT3 pathway) in 2 AD mouse models have different effects on the same disease outcome (amyloid plaques), assessed with the same method (MXO4) underlines that astrocyte reaction is highly context-dependent. How can the discrepancies between these 2 AD models be explained? In 16-month-old 3xTg mice, both amyloid and tau pathologies are present, whereas only amyloid pathology develops in APP/PS1dE9 mice. This important difference (in addition to other differences such as sex, genetic background, and genetic constructs) could change the mechanisms of amyloid production, accumulation, aggregation, and clearance. In addition, mutant tau itself impacts astrocyte physiology (Dabir et al., 2006;

Leyns and Holtzman, 2017) and could directly change their ability to clear amyloid.

Most importantly, accumulating evidence shows that astrocytes and their reactive counterparts are heterogeneous. Reactive astrocytes may adopt different molecular and functional states depending on the pathological context, and they could subsequently influence disease processes differentially (Anderson et al., 2014; Escartin et al., 2019). Therefore, even if the causes for SOCS3 differential impact on amyloid deposition in 3xTg and APP/PS1dE9 mice were not identified, our studies illustrate that reactive astrocytes have complex and subtle effects *in vivo*, and call for caution in generalizing their roles in disease. In particular, this study was performed on female mice, and the same experiments should be reproduced in males.

4.3. Inhibition of reactive astrocytes does not restore spatial memory but reduces anxiety in 3xTg mice

We previously reported that SOCS3 expression in astrocytes fully restored early synaptic and long term potentiation alterations in 9-month-old 3xTg mice (Ceyzériat et al., 2018). Here, we explored whether this normalization of synaptic activity translated into improved short-term memory and reduced anxiety in 3xTg mice. We found that 8-month-old 3xTg mice displayed working memory alterations on the Y maze and normal levels of anxiety on the elevated plus maze. SOCS3 did not influence this behavioral deficit at this early stage. At 14 months, 3xTg mice displayed altered spatial memory and increased anxiety. Unexpectedly, blocking reactive astrocytes with SOCS3 reduced anxiety but did not improve working memory.

The absence of SOCS3 effect on working memory could be explained by the fact that this type of memory involves other brain structures besides the targeted hippocampus. For example, it is now admitted that the prefrontal cortex is involved in spatial information processing (Funahashi, 2017). Accordingly, we found that SOCS3 was able to improve spatial learning but not memory retrieval on the Morris water maze in APP/PS1dE9 mice (Ceyzériat et al., 2018), further stressing the role of complex brain circuits for memory tasks. A strategy targeting the JAK-STAT3 pathway in a larger part of the brain through multiple injections with intravenous delivery of blood brain barrier permeant vectors encoding SOCS3 or pharmacological approaches would help uncover the effects of reactive astrocytes on memory impairment in AD mice.

Conversely, reduced anxiety after AAV-SOCS3 injection in the dorsal hippocampus of 3xTg-SOCS3 mice was unexpected, because anxiety-related behaviors are thought to be controlled by the ventral hippocampus and amygdala (Bannerman et al., 2004; Calhoon and Tye, 2015). However, recent data describe extensive connections within subfields of the hippocampus and between the hippocampus and other limbic areas (Bienkowski et al., 2018). Therefore, it is possible that targeting only a fraction of the hippocampus can impact larger brain circuits that regulate anxiety. Another non-exclusive possibility is that gap junction-based astrocyte networks could propagate SOCS3 effects and influence distant hippocampal neurons.

Anxiety-related behaviors were evaluated on the elevated plus maze, as the mouse propensity to explore anxiogenic open arms. Additional tests like the open field would be useful to better delineate anti-anxiogenic effects of SOCS3 in 3xTg mice. Interestingly, we observed that 3xTg mice remained in the start arm of the Y maze, an indication of increased anxiety and this was corrected by SOCS3 as well, further demonstrating its positive effect on anxiety.

When do reactive astrocytes start to play a role in AD pathogenesis? Reactive glial cells (astrocytes and microglia) appear in response to an abnormal environment (e.g., dysfunctional neurons,

presence of toxic oligomerized proteins; Ben Haim et al., 2015a). But, positron emission tomography studies on prodromal AD patients showed that reactive glial cells may be present at early disease stages, before overt signs of amyloid deposition (Hamelin et al., 2016; Heneka et al., 2005). In accordance, our results indicate that reactive astrocytes contribute to early synaptic deficits, before amyloid deposition (Ceyzériat et al., 2018) and their inhibition may improve some behavioral outcomes without reducing A β and Tau pathologies.

5. Conclusions

Overall, the JAK2-STAT3 pathway appears as a core signaling cascade for reactive astrocytes. By modulating this pathway in different models of neurodegenerative diseases, we show that reactive astrocytes are multifaceted cells, with subtle functional effects, depending on the specific disease context. Our vector-based strategy is versatile and efficient to dissect out the roles of JAK2-STAT3-dependent reactive astrocytes in different pathological conditions. A better understanding of the molecular changes occurring in reactive astrocytes and their impact on neurons is required to devise efficient therapeutic strategies targeting astrocytes.

CRedit authorship contribution statement

Océane Guillemaud: Investigation, Formal analysis, Visualization, Writing - review & editing. **Kelly Ceyzériat:** Investigation, Formal analysis, Visualization, Writing - review & editing. **Thomas Saint-Georges:** Investigation. **Karine Cambon:** Methodology, Writing - review & editing. **Fanny Petit:** Investigation. **Lucile Ben Haim:** Methodology, Writing - review & editing. **Maria-Angeles Carrillo-de Sauvage:** Investigation, Writing - review & editing. **Martine Guillermier:** Investigation, Writing - review & editing. **Sueva Bernier:** Investigation. **Anne-Sophie Hérard:** Resources, Writing - review & editing. **Charlène Joséphine:** Resources. **Alexis Pierre Bémelmans:** Resources. **Emmanuel Brouillet:** Funding acquisition, Writing - review & editing. **Philippe Hantraye:** Funding acquisition. **Gilles Bonvento:** Resources, Writing - review & editing. **Carole Escartin:** Conceptualization, Data curation, Supervision, Funding acquisition, Writing - original draft.

Acknowledgements

We are grateful to D. Cheramy and Dr. E. Diguët (Servier) for sharing their expertise and equipment for MSD kits. We thank A. Panatier and S.H.R. Olié (Neurocentre Magendie, Bordeaux, France) for providing 4-month-old 3xTg mice of the 3rd cohort, as well as D. Gonzales, S. Laumond, J. Tessaire, and people at the animal facility of the Neurocentre Magendie for mouse care and genotyping. We thank L. Vincent, K. Bastide, P. Woodling, and J.M. Hélias for their help with mouse housing and transfer. We are very grateful to Dr. J. Martin for his careful reading of the manuscript.

Funding sources: This study was supported by CEA, CNRS, and grants from the French National Research Agency (grants # 2010-JCJC-1402-1, 2011-BSV4-021-03, and ANR-16-TERC-0016-01 to CE, and 2011-INBS-0011 NeurATRIS to PH), from Fondation Vaincre Alzheimer (grant # FR-15015 to CE) and Association France Alzheimer and Fondation de France (Prix Spécial 2012 to GB). CE received support from the Fédération pour la Recherche sur le Cerveau. OG, KC, and LBH are recipients of a doctoral fellowship from the CEA.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2020.02.010>.

References

- Abeti, R., Abramov, A.Y., Duchon, M.R., 2011. Beta-amyloid activates PARP causing astrocytic metabolic failure and neuronal death. *Brain* 134 (Pt 6), 1658–1672.
- Allaman, I., Gavillet, M., Belanger, M., Laroche, T., Vierter, D., Lashuel, H.A., Magistretti, P.J., 2010. Amyloid-beta aggregates cause alterations of astrocytic metabolic phenotype: impact on neuronal viability. *J. Neurosci.* 30, 3326–3338.
- Anderson, M.A., Ao, Y., Sofroniew, M.V., 2014. Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci. Lett.* 565, 23–29.
- Anderson, M.A., Burda, J.E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T.M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B.S., Deming, T.J., Sofroniew, M.V., 2016. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* 532, 195–200.
- Arranz, A.M., De Strooper, B., 2019. The role of astroglia in Alzheimer's disease: pathophysiology and clinical implications. *Lancet Neurol.* 18, 406–414.
- Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., Hyman, B.T., 1992. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42 (3 Pt 1), 631–639.
- Bannerman, D.M., Rawlins, J.N., McHugh, S.B., Deacon, R.M., Yee, B.K., Bast, T., Zhang, W.N., Pothuizen, H.H., Feldon, J., 2004. Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 273–283.
- Ben Haim, L., Carrillo-de Sauvage, M.A., Ceyzeriat, K., Escartin, C., 2015a. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 278.
- Ben Haim, L., Ceyzeriat, K., Carrillo-de Sauvage, M.A., Aubry, F., Auregan, G., Guillermier, M., Ruiz, M., Petit, F., Houitte, D., Faivre, E., Vandesquille, M., Aron-Badin, R., Dhenain, M., Deglon, N., Hantraye, P., Brouillet, E., Bonvento, G., Escartin, C., 2015b. The JAK/STAT3 pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's diseases. *J. Neurosci.* 35, 2817–2829.
- Bienkowski, M.S., Bowman, I., Song, M.Y., Gou, L., Ard, T., Cotter, K., Zhu, M., Benavidez, N.L., Yamashita, S., Abu-Jaber, J., Azam, S., Lo, D., Foster, N.N., Hintiryan, H., Dong, H.W., 2018. Integration of gene expression and brain-wide connectivity reveals the multiscale organization of mouse hippocampal networks. *Nat. Neurosci.* 21, 1628–1643.
- Blanchard, J., Wanka, L., Tung, Y.C., Cardenas-Aguayo Mdel, C., LaFerla, F.M., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., 2010. Pharmacologic reversal of neurogenic and neuroplastic abnormalities and cognitive impairments without affecting A β and tau pathologies in 3xTg-AD mice. *Acta Neuropathol.* 120, 605–621.
- Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239–259.
- Calhoun, G.G., Tyte, K.M., 2015. Resolving the neural circuits of anxiety. *Nat. Neurosci.* 18, 1394–1404.
- Carroll, J.C., Rosario, E.R., Chang, L., Stanczyk, F.Z., Oddo, S., LaFerla, F.M., Pike, C.J., 2007. Progesterone and estrogen regulate Alzheimer-like neuropathology in female 3xTg-AD mice. *J. Neurosci.* 27, 13357–13365.
- Carroll, J.C., Rosario, E.R., Kreimer, S., Villamagna, A., Gentzsch, E., Stanczyk, F.Z., Pike, C.J., 2010. Sex differences in beta-amyloid accumulation in 3xTg-AD mice: role of neonatal sex steroid hormone exposure. *Brain Res.* 1366, 233–245.
- Ceyzeriat, K., Abjean, L., Carrillo-de Sauvage, M.A., Ben Haim, L., Escartin, C., 2016. The complex STATES of astrocyte reactivity: how are they controlled by the JAK-STAT3 pathway? *Neuroscience* 330, 205–218.
- Ceyzeriat, K., Ben Haim, L., Denizot, A., Pommier, D., Matos, M., Guillemaud, O., Palomares, M.A., Abjean, L., Petit, F., Gipchtein, P., Gaillard, M.C., Guillermier, M., Bernier, S., Gaudin, M., Auregan, G., Josephine, C., Dechamps, N., Veran, J., Langlais, V., Cambon, K., Bemelmans, A.P., Baijor, J., Bonvento, G., Dhenain, M., Deleuze, J.F., Oliet, S.H.R., Brouillet, E., Hantraye, P., Carrillo-de Sauvage, M.A., Olaso, R., Panatier, A., Escartin, C., 2018. Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 6, 104.
- Chun, H., Lee, C.J., 2018. Reactive astrocytes in Alzheimer's disease: a double-edged sword. *Neurosci. Res.* 126, 44–52.
- Dabir, D.V., Robinson, M.B., Swanson, E., Zhang, B., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., Forman, M.S., 2006. Impaired glutamate transport in a mouse model of tau pathology in astrocytes. *J. Neurosci.* 26, 644–654.
- De Strooper, B., Karran, E., 2016. The cellular phase of Alzheimer's disease. *Cell* 164, 603–615.
- Delekate, A., Fuchtemeier, M., Schumacher, T., Ulbrich, C., Foddiss, M., Petzold, G.C., 2014. Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. *Nat. Commun.* 5, 5422.
- Escartin, C., Guillemaud, O., Carrillo de Sauvage, M.A., 2019. Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia* 67, 2221–2247.
- Funahashi, S., 2017. Working memory in the prefrontal cortex. *Brain Sci.* 7, 49.
- Furman, J.L., Sama, D.M., Gant, J.C., Beckett, T.L., Murphy, M.P., Bachstetter, A.D., Van Eldik, L.J., Norris, C.M., 2012. Targeting astrocytes ameliorates neurologic changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 32, 16129–16140.
- Goni, F., Herline, K., Peyser, D., Wong, K., Ji, Y., Sun, Y., Mehta, P., Wisniewski, T., 2013. Immunomodulation targeting of both A β and tau pathological conformers ameliorates Alzheimer's disease pathology in TgSwDI and 3xTg mouse models. *J. Neuroinflammation* 10, 150.
- Hamelin, L., Lagarde, J., Dorothee, G., Leroy, C., Labit, M., Comley, R.A., de Souza, L.C., Corne, H., Dauphinot, L., Bertoux, M., Dubois, B., Gervais, P., Colliot, O., Potier, M.C., Bottlaender, M., Sarazin, M., Clinical, I.T., 2016. Early and protective microglial activation in Alzheimer's disease: a prospective study using 18F-DPA-714 PET imaging. *Brain* 139 (Pt 4), 1252–1264.
- Hardy, J.A., Higgins, G.A., 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185.
- Heneka, M.T., Carson, M.J., El Khoury, J., Landreth, G.E., Brosseron, F., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R.M., Herrup, K., Frautschi, S.A., Finsen, B., Brown, G.C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G.C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M.L., Perry, V.H., Holmes, C., Bazan, N.G., Brooks, D.J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C.A., Breitner, J.C., Cole, G.M., Golenbock, D.T., Kummer, M.P., 2015. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 14, 388–405.
- Heneka, M.T., Sastre, M., Dumitrescu-Ozimek, L., Dewachter, I., Walter, J., Klockgether, T., Van Leuven, F., 2005. Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP [V717I] transgenic mice. *J. Neuroinflammation* 2, 22.
- Hirata-Fukae, C., Li, H.F., Hoe, H.S., Gray, A.J., Minami, S.S., Hamada, K., Niikura, T., Hua, F., Tsukagoshi-Nagai, H., Horikoshi-Sakuraba, Y., Mughal, G.W., LaFerla, F.M., Mattson, M.P., Iwata, N., Saido, T.C., Klein, W.L., Duff, K.E., Aisen, P.S., Matsuoka, Y., 2008. Females exhibit more extensive amyloid, but not tau, pathology in an Alzheimer transgenic model. *Brain Res.* 1216, 92–103.
- Hol, E.M., Pekny, M., 2015. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 32, 121–130.
- Jo, S., Yarishkin, O., Hwang, Y.J., Chun, Y.E., Park, M., Woo, D.H., Bae, J.Y., Kim, T., Lee, J., Chun, H., Park, H.J., Lee, D.Y., Hong, J., Kim, H.Y., Oh, S.J., Park, S.J., Lee, H., Yoon, B.E., Kim, Y., Jeong, Y., Shim, I., Bae, Y.C., Cho, J., Kowall, N.W., Ryu, H., Hwang, E., Kim, D., Lee, C.J., 2014. GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 20, 886–896.
- Kahlson, M.A., Colodner, K.J., 2015. Glial tau pathology in tauopathies: functional consequences. *J. Exp. Neurosci.* 9 (Suppl.2), 43–50.
- Kametani, F., Hasegawa, M., 2018. Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.* 12, 25.
- Leyns, C.E.G., Holtzman, D.M., 2017. Glial contributions to neurodegeneration in tauopathies. *Mol. Neurodegener.* 12, 50.
- Li, S., Jin, M., Liu, L., Dang, Y., Ostaszewski, B.L., Selkoe, D.J., 2018. Decoding the synaptic dysfunction of bioactive human AD brain soluble A β to inspire novel therapeutic avenues for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 6, 121.
- Lian, H., Yang, L., Cole, A., Sun, L., Chiang, A.C., Fowler, S.W., Shim, D.J., Rodriguez-Rivera, J., Tagliatela, G., Jankowsky, J.L., Lu, H.C., Zheng, H., 2015. Nf-kappaB-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease. *Neuron* 85, 101–115.
- Masliah, E., Alford, M., DeTeresa, R., Mallory, M., Hansen, L., 1996. Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 40, 759–766.
- Masters, C.L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C.C., Sperling, R.A., Cummings, J.L., 2015. Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Dis. Primers* 1, 15056.
- Medina, M., Avila, J., 2014. New perspectives on the role of tau in Alzheimer's disease. Implications for therapy. *Biochem. Pharmacol.* 88, 540–547.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., LaFerla, F.M., 2003. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409–421.
- Querfurth, H.W., LaFerla, F.M., 2010. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 362, 329–344.
- Reichenbach, N., Delekate, A., Plescher, M., Schmitt, F., Krauss, S., Blank, N., Halle, A., Petzold, G.C., 2019. Inhibition of Stat3-mediated astrogliosis ameliorates pathology in an Alzheimer's disease model. *EMBO Mol. Med.* 11, e9665.
- Ries, M., Sastre, M., 2016. Mechanisms of A β clearance and degradation by glial cells. *Front. Aging Neurosci.* 8, 160.
- Sala Frigerio, C., De Strooper, B., 2016. Alzheimer's disease mechanisms and emerging roads to novel therapeutics. *Annu. Rev. Neurosci.* 39, 57–79.
- Sancheti, H., Patil, I., Kanamori, K., Diaz Brinton, R., Zhang, W., Lin, A.L., Cadenas, E., 2014. Hypermetabolic state in the 7-month-old triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease and the effect of lipoic acid: a 13C-NMR study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34, 1749–1760.
- Serrano-Pozo, A., Froesch, M.P., Masliah, E., Hyman, B.T., 2011. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1, a006189.
- Sompol, P., Furman, J.L., Pleiss, M.M., Kraner, S.D., Artushin, I.A., Batten, S.R., Quintero, J.E., Simmerman, L.A., Beckett, T.L., Lovell, M.A., Murphy, M.P., Gerhardt, G.A., Norris, C.M., 2017. Calcineurin/NFAT signaling in activated astrocytes drives network hyperexcitability in A β -bearing mice. *J. Neurosci.* 37, 6132–6148.
- Verkhratsky, A., Nedergaard, M., 2018. Physiology of astroglia. *Physiol. Rev.* 98, 239–389.
- West, M.J., Gundersen, H.J., 1990. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 296, 1–22.
- Wu, Z., Guo, Z., Gearing, M., Chen, G., 2014. Tonic inhibition in dentate gyrus impairs long-term potentiation and memory in an Alzheimer's disease model. *Nat. Commun.* 5, 4159.

III. Exploration de l'hétérogénéité des astrocytes réactifs

Dans les deux articles précédents, nous avons étudié l'implication des astrocytes réactifs sur différents symptômes pathologiques dans deux modèles murins de la MA par une stratégie de modulation sélective des astrocytes réactifs. Dans les souris APP, notre étude révèle un effet majoritairement délétère des astrocytes réactifs sur différents index de la pathologie comme le nombre de plaques amyloïdes et l'apprentissage spatial (**Article 1**). Chez les souris 3xTg, la modulation de la réactivité astrocytaire n'a pas d'effet sur la charge amyloïde, la pathologie Tau ainsi que la mémoire spatiale mais elle améliore la transmission et la plasticité synaptique ainsi que l'anxiété (**Article 2**).

Ces résultats différentiels observés suite à une même stratégie de modulation de la réactivité suggèrent d'ores et déjà que la réactivité astrocytaire est complexe et son implication dépendante du contexte pathologique. En effet, les études récentes présentées en introduction montrent que la réactivité astrocytaire est une réponse hétérogène associée à une diversité moléculaire et fonctionnelle (paragraphe II.4). Cette nouvelle vision de l'hétérogénéité des astrocytes réactifs souligne ainsi la nécessité de ré-aborder leurs rôles dans la MA en considérant l'existence de classes moléculaires et fonctionnelles qui pourraient influencer différemment les neurones environnants. Cependant, les signaux et cascades de signalisation qui contrôlent une telle diversité ne sont, à ce jour, pas identifiés et on ne sait pas comment les différentes classes d'astrocytes réactifs sont générées. Nous émettons donc l'hypothèse que différentes cascades de signalisation contrôlent des classes d'astrocytes réactifs distinctes. Ces classes seraient alors définies par une signature moléculaire propre et des fonctions spécifiques.

Dans cette dernière partie de la thèse, nous avons donc choisi d'étudier directement l'hétérogénéité des astrocytes réactifs dans les souris APP. Ce projet de recherche, toujours en cours, est basé sur des nouveaux outils et des méthodes permettant l'analyse à l'échelle cellulaire.

Cette étude a donc pour but de mieux comprendre et caractériser l'hétérogénéité des astrocytes réactifs chez les souris APP. Pour cela, 1) nous identifierons les cascades de signalisation activées dans chaque classe d'astrocytes réactifs. 2) Nous étudierons le profil moléculaire de ces classes et enfin, 3) nous déterminerons si ces classes sont associées à des fonctions propres.

1. Matériels et méthodes

1.1. Modèle murin de la maladie d'Alzheimer

1.1.1. *Elevage*

Les souris ont été hébergées en groupe de 5 individus dans des cages à température et hygrométrie constantes comportant un enrichissement de jeu et de nidification. Les accès à la nourriture et l'eau étaient disponibles *ad libitum*. Les animaux ont été maintenus en cycle jour/nuit de 12 heures. Toutes les procédures ont été évaluées et approuvées par un comité d'éthique local indépendant et par le Ministère français de

l'Education et de la Recherche, en conformité avec la réglementation de l'Union Européenne (Directive 2010-63/EEC).

1.1.2. Souris transgéniques APP/PS1dE9

Des mâles transgéniques hétérozygotes APP/PS1dE9 co-exprimant la protéine APP humanisée portant les mutations APP^{swe} (K595N/M596L) ainsi que la PS1 humaine dépourvue de l'exon 9 (PS1dE9), sous contrôle d'un promoteur de la protéine prion de souris sous fond génétique C57BL/6J ont été utilisés (Jankowsky, Fadale, et al., 2004a). Un génotypage de ces souris a été réalisé par PCR (Polymerase chain reaction) à partir d'ADN extrait de biopsie d'oreille en utilisant le kit « KAPA mouse genotyping kit » (Clinisciences). La taille des amplicons a été vérifiée par migration des échantillons sur un gel d'agarose à 2%. Les amorces suivantes ont été utilisées : APP-F AGGACTGACCACTCGACCAG ; APP-R CGGGGGTCTAGTTCTGCAT. Des souris WT « littermates » ont été utilisées comme souris contrôles.

1.2. Vecteurs lentiviraux

1.2.1. Construction des vecteurs

Les vecteurs lentiviraux sont dérivés du virus de l'immunodéficience humaine dont les séquences responsables de la pathogénicité ainsi que de la réplication ont été excisées. Les régions promotrices et enhancer des LTR (Long terminal repeats) sont également délétées pour réduire la pathogénicité, on parle de vecteur SIN (self-inactivating) (Zufferey et al., 1998). Enfin, une séquence de stabilisation post-transcriptionnelle issue du virus de l'hépatite de la marmotte nommée WPRE (Woodchuck hepatitis virus post transcriptional element) est utilisée pour son effet positif sur l'expression du transgène. Ainsi les vecteurs lentiviraux s'intègrent de manière efficace et non génotoxique dans le génome des cellules infectées pour permettre une expression stable dans le temps du gène d'intérêt (Dégion et al., 2000).

Pour transduire les astrocytes principalement et faire exprimer les transgènes d'intérêt dans ces cellules, l'enveloppe Mokola du virus de la rage a été utilisée (Colin et al., 2009). Différentes constructions ont été utilisées pour suivre l'activité des cascades de signalisation. Chaque vecteur rapporteur est ainsi composé d'une séquence codant pour une protéine fluorescente placée sous le contrôle d'un motif ADN répété reconnu par un facteur de transcription. Ce motif consensus est répété 6 fois et couplé à un promoteur minimal. Deux vecteurs permettant de mesurer l'activation de la voie STAT3 ont été utilisés, l'un associé à la GFP et l'autre à la Tomato (nommés SRE-GFP ou SRE-Tomato, SRE pour STAT3 responsive element), en fonction des besoins de l'expérience. Un vecteur permettant de mesurer l'activation de la voie NF- κ B par combinaison avec la CFP a été utilisé (nommé NRE-CFP, NRE pour NF- κ B responsive element). Afin de mieux distinguer la CFP des autres marquages, un signal de localisation nucléaire a été fusionné à la protéine CFP dans la séquence du vecteur NRE-CFP (**Figure 26**). Ainsi l'expression des protéines GFP ou Tomato associées à la voie STAT3 sera cytoplasmique alors que l'expression de la CFP associée à la voie NF- κ B sera nucléaire. La construction et la caractérisation initiale de ces vecteurs a été réalisée par 2 anciennes doctorantes de

l'équipe, Lucile Ben Haim et Laurene Abjean, ainsi qu'une ancienne post-doctorante, Ludmila Juricek.

Pour les expériences de validation du tropisme astrocytaire, des vecteurs lentiviraux pseudotypés Mokola et composés d'une séquence codant pour la GFP sous contrôle d'un promoteur ubiquitaire PGK (Phosphoglycerate kinase) (PGK-GFP) ont été injectés le striatum de souris WT.

Dans les expériences de validation des protéines rapportrices comme témoin de l'activation des cascades, un groupe contrôle a été injecté avec des vecteurs lentiviraux (enveloppe Mokola) de promoteur ubiquitaire PGK associé aux protéines fluorescentes GFP ou Tomato (PGK-GFP ou PGK-Tomato).

Enfin, pour vérifier la sensibilité du rapporteur SRE-GFP à la voie JAK2-STAT3, un lentivirus (LV) pseudotypé Mokola et codant pour une forme constitutivement active de JAK2 appelé LV-JAK2ca a été utilisé pour activer la voie dans les astrocytes. Ce vecteur a été co-injecté dans un hémisphère avec le rapporteur SRE-GFP. L'autre hémisphère a été co-injecté avec le rapporteur SRE-GFP et un LV contrôle codant pour la β -galactosidase, appelé LV-LacZ.

1.2.2. Production des virus

La production virale a été réalisée par la plateforme du laboratoire selon un protocole de transfection transitoire de cellules 293T. Brièvement, les cellules ont été transfectées par 4 plasmides : un plasmide vecteur portant la séquence Ψ , signal d'encapsidation ainsi que le gène d'intérêt ; un plasmide de transcomplémentation permettant la production de l'ensemble des protéines virales ; un plasmide encodant le gène rev de régulation de l'expression des protéines du virion et enfin, un plasmide encodant l'enveloppe du vecteur, Mokola (Hottinger et al., 2000). Quarante huit heures après transfection, les surnageants ont été collectés et les particules virales ont été sédimentées par ultracentrifugation. Leurs titres ont été déterminés par quantification ELISA de la protéine de capsid p24.

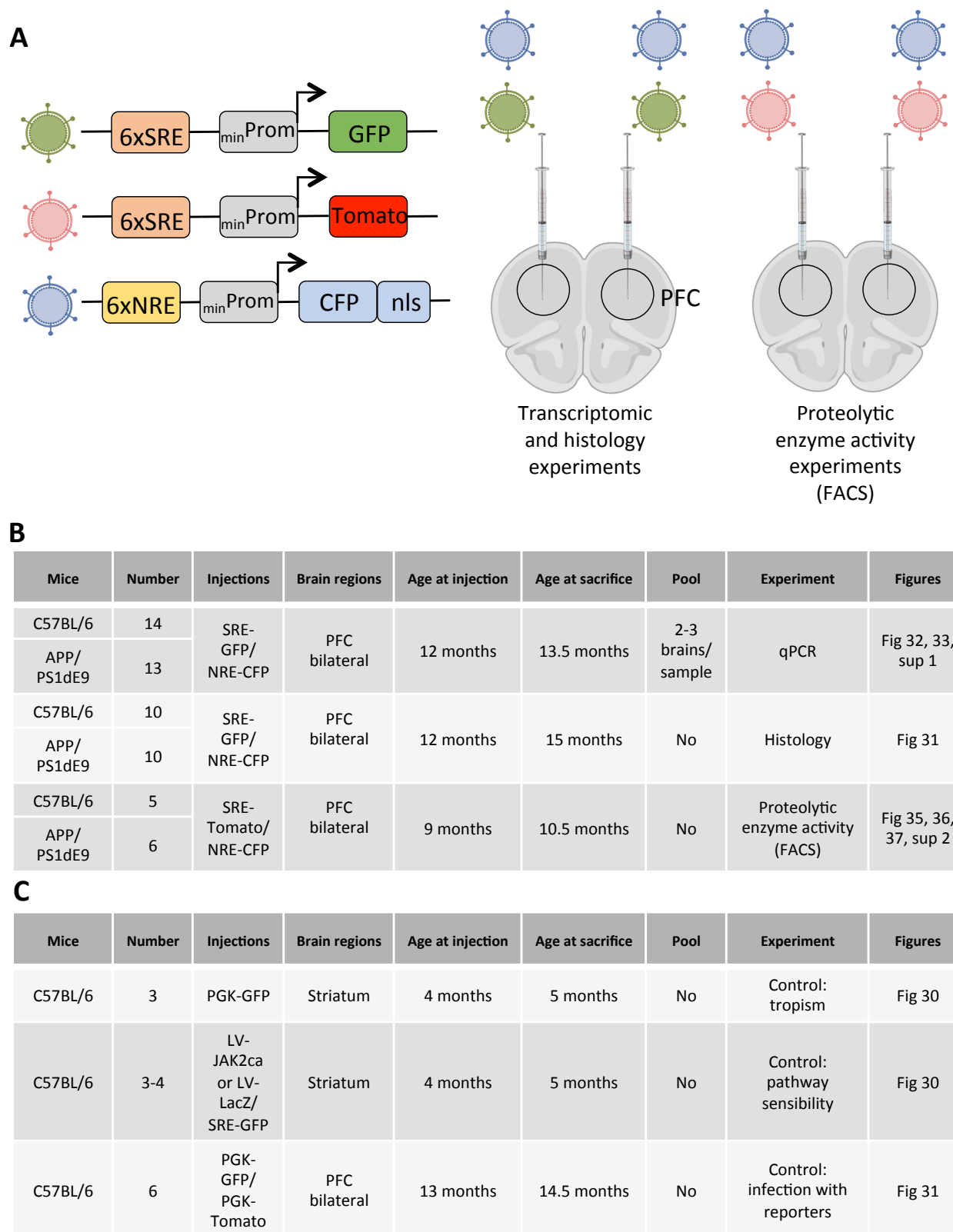


Figure 26. Schéma expérimental. A. Schéma expérimental représentant les différentes constructions lentivirales utilisées en fonction des expériences. Ces constructions ont été injectées dans le cortex préfrontal de souris mâles WT ou APP. B. Liste des expériences réalisées et leurs caractéristiques en terme d'effectifs, d'injection et de chronologie. C. Liste des expériences contrôles et leurs caractéristiques. *SRE*: *STAT3 responsive element*; *NRE*: *NF-κB responsive element*; *nls*: *nuclear localization signal*; *PFC*: *Prefrontal cortex*; *FACS*: *Fluorescence-activated cell sorting*.

1.2.3. Injections stéréotaxiques

Les souris ont été anesthésiées par injection intra-péritonéale de kétamine (100 mg/kg)/médétomidine (0.25 mg/kg) suivi d'une injection d'atipemazole (0.25 mg/kg) au réveil. Une injection sous-cutanée de lidocaïne (7 mg/kg) a également été réalisée au niveau du crâne 10 min avant la chirurgie. Les animaux ont été injectés bilatéralement dans le cortex préfrontal (PFC) (antéro-postérieur : + 2.80 mm ; latéral +/- 1 mm ; ventral -2.25 mm, coordonnées stéréotaxiques par rapport au Bregma, coordonnées ventrales par rapport à l'os) avec 2 µl de solution de vecteur, injectés à une vitesse de 0.2 µl/min (**Figure 26**). Ces vecteurs ont été dilués dans 0.1 M PBS (Phosphate-buffered saline) avec 1% BSA (Bovine Serum Albumine) à une concentration finale de 100 ng p24/µl. Ce titre a été choisi afin d'éviter l'inflammation due au vecteur tout en infectant une partie importante du PFC ($V_{\text{moyen}} = 2 \text{ mm}^3$). En fonction de l'expérience, les souris APP ou WT ont ainsi été injectées entre 9-12 mois avec les constructions suivantes : SRE-GFP ou SRE-Tomato en combinaison avec NRE-CFP. Ces souris ont ensuite été sacrifiées entre 1.5 et 2 mois post-injection (**Figure 26**).

Dans le cas des expériences contrôles de tropisme ou de sensibilité du rapporteur SRE-GFP à la voie JAK2-STAT3, des souris WT ont été injectées dans le striatum selon le même protocole (antéro-postérieur : + 1 mm ; latéral +/- 2 mm ; ventral -2.5 mm) (**Figure 26**).

1.3. Histologie

1.3.1. Préparation des échantillons

Tous les animaux ont été sacrifiés par une overdose de pentobarbital sodique (180 mg/kg) avant de procéder à une perfusion intra cardiaque de 4% paraformaldehyde. Les cerveaux ont ensuite été cryo-protégés par incubation dans une solution de sucrose à 30% et des coupes coronales de 30 µm ont été réalisées au microtome à congélation et collectées de manière sériée. Huit séries ont été générées et conservées dans une solution de stockage (éthylène glycol, glycérol, PB 1M, H₂O_d) à -20°C avant utilisation.

Immunofluorescence

Les coupes de souris injectées avec les rapporteurs SRE-GFP et NRE-CFP ont été rincées dans du PBS 0.1 M, 3 x 10 min puis bloquées dans une solution de 4.5% NGS (Normal Goat Serum)/PBS 0.1 M/0.2% Triton X-100 (PBST), 1h à température ambiante. Elles ont été incubées sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire GFAP-Cy3 (**Table 2**) dilué dans du PBS 0.1 M, 3 x 10 min. Après rinçage, les coupes ont été montées sur des lames (Superfrost) avec le milieu de montage Vectashield et recouvertes par des lamelles adaptées pour le confocal. Un protocole similaire a été appliqué pour les expériences de tropisme ou les coupes de souris injectées avec un LV PKG-GFP ont été incubées avec les anticorps primaires anti Iba1 ou NeuN (**Table 2**). Pour le marquage STAT3α, les coupes ont été prétraitées avec une solution 100% méthanol, 10 min à -20°C, rincées et bloquées 1h dans une solution 4.5% NGS/PBS 0.1 M/0.3% Triton X-100. Elles ont ensuite été incubées avec l'anticorps primaire anti- STAT3α (**Table 2**) dans la solution « Signal stain antibody diluent » (Cell Signaling, #8112L), 72h à 4°C. Après rinçage, les coupes ont été incubées avec l'anticorps secondaire approprié (Alexafluor,

Invitrogen) dilué au 1/500 dans une solution 1% BSA/PBS 0.1 M/0.3% Triton X-100, 1h à température ambiante.

Anticorps	Références	Espèces	Dilution
GFAP-Cy3	Sigma		1/500
Iba1	Wako	Lapin	1/500
NeuN	Chemicon	Souris	1/500
STAT3 α	Cell Signaling	Lapin	1/200

Tableau 2. Références des anticorps utilisés et leurs dilutions.

1.3.2. Comptage des cellules SRE-GFP/NRE-CFP

Les coupes marquées avec les rapporteurs lentiviraux SRE-GFP et NRE-CFP ont été acquises par microscopie confocale (Leica TCS SPE) à l'objectif 20X en utilisant les longueurs d'ondes suivantes : $\lambda_{exc}(GFP)= 488nm$, $\lambda_{emi}(GFP)= 503-540nm$, $\lambda_{exc}(CFP)= 405nm$, $\lambda_{emi}(CFP)= 450-525nm$. Des mosaïques dans le plan XY couvrant l'ensemble de la zone infectée et sur une épaisseur de 10 μm avec un pas de 1 μm en Z ont été réalisées. Les mosaïques 3D ont été projetées en Z avant d'être analysées et une macro a été réalisée sous Image J afin de traiter de façon identique les mosaïques de tous les animaux. Les étapes de cette macro qui inclue des étapes manuelles sont les suivantes : la zone d'injection, identifiée par l'expression de la GFP cytoplasmique qui est la plus étendue, a été manuellement délimitée avec le logiciel Image J sur chacune des mosaïques. Un seuillage en niveau de gris a été réalisé pour chacun des canaux GFP et CFP. Le nombre de cellules ou « particules » a ensuite été automatiquement détecté pour chaque canal avec le module « analyse particules » d'Image J avec un critère de taille des particules de 15 μm^2 -infini. Chacune des ROI (region of interest) de ces particules a été enregistrée et numérotée pour chaque canal. Pour analyser les co-expressions entre la GFP et la CFP, la fonction logique AND d'Image J a été utilisée. Cette dernière consiste à créer une image composite binaire comprenant uniquement les cellules double-positives GFP⁺/CFP⁺. En analysant le nombre de particules avec un critère de taille de 10 μm^2 -infini sur cette image composite, on a ainsi la mesure du nombre de cellules double-positives. Ces ROI ont été reportées sur l'image combinée en fausses couleurs afin de vérifier l'efficacité et la spécificité de la détection automatique et corriger manuellement les erreurs d'assignation. A ce stade, seules les cellules double-positives GFP⁺/CFP⁺ ont été comptées. Afin de compter les cellules « simple positives » GFP⁺ ou CFP⁺, les ROI des particules GFP⁺ seules et CFP⁺ seules, précédemment établies sur les images binaires de chaque canal, ont été ajoutées à l'image combinée initiale en fausses couleurs. Pour faciliter l'identification des cellules simples CFP ou GFP, les particules GFP⁺ ont été affichées avec un trait vert d'épaisseur 1 ; les particules CFP⁺ ont été affichées avec une couleur de remplissage rouge ; et enfin, les particules GFP⁺/CFP⁺ ont été affichées avec un trait jaune d'épaisseur 0. Le nombre de cellules simples CFP⁺ (particules uniquement rouges) étant faible, il est possible de les compter manuellement. Enfin, pour compter le nombre de cellules simples GFP⁺, la fonction logique OR d'Image J a été utilisée. Celle-ci consiste à créer une image composite binaire comprenant toutes les cellules, qu'elles soient simples ou doubles

positives. En analysant le nombre de particules avec un critère de taille de $25 \mu\text{m}^2$ -infini sur cette image, on a ainsi la mesure du nombre total de cellules positives. Par soustraction du nombre de cellules double GFP⁺/CFP⁺ et simple CFP⁺ au nombre de cellules totales, le nombre de cellules GFP⁺ a ainsi pu être calculé.

Les acquisitions des coupes ainsi que le comptage des cellules ont été réalisés par Ludmila Juricek, une ancienne post-doctorante de l'équipe.

Les coupes de souris injectées avec un LV PGK-GFP puis marquées avec les anticorps spécifiques de différentes populations cellulaires (GFAP, Iba1, NeuN) ou les coupes de souris injectées avec les rapporteurs SRE-GFP et NRE-CFP et marquées avec STAT3, ont été acquises par microscopie confocale (Leica, TCS SPE), à l'objectif 40X.

Dans l'expérience de co-localisation entre les LV PGK-GFP et PGK-Tomato, les cellules ont été manuellement comptées en utilisant le logiciel Image J.

1.4. Tri cellulaire par cytométrie en flux

1.4.1. *Dissociation des cellules*

Les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale et les cerveaux rapidement prélevés. En particulier, le PFC, correspondant à la zone d'injection, a été prélevé en réalisant sur glace, des coupes coronales de 1 mm d'épaisseur à l'aide d'une matrice sur l'avant du cerveau. Pour les expériences de qPCR sur astrocytes triés, les PFCs de 3 souris ont été rassemblés dans le but de collecter assez de matériel. Les PFCs ont ensuite été placés dans une solution froide d'HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) sans Mg²⁺ ni Ca²⁺ (Sigma, #55021C). Les cellules ont ensuite été dissociées mécaniquement et enzymatiquement en utilisant des pipettes Pasteur polies et un kit de dissociation tissulaire à la papaïne (Miltenyi, #130-092-628). Afin de maximiser la séparation des cellules et éviter les contaminations, les débris de myéline ont été enlevés en utilisant des billes magnétiques couplées à un anticorps fixant la myéline (Myelin removal beads II, Miltenyi, #130-096-731) et des colonnes MS (Miltenyi, #130-042-201) placées sur un aimant comme décrit dans le protocole du fournisseur. Les échantillons ont ensuite été centrifugés 10 min à 300 g, le surnageant a été jeté et les cellules dissociées ont été re-suspendues dans 400 μl d'HBSS avec Mg²⁺ et Ca²⁺ (Sigma, #55037C). Les différentes populations d'astrocytes réactifs (SRE-GFP⁺ ; NRE-CFP⁺ ; SRE-GFP⁺/NRE-CFP⁺) ont été directement triées grâce à leur niveau d'expression des protéines fluorescentes par FACS (Figure 27).

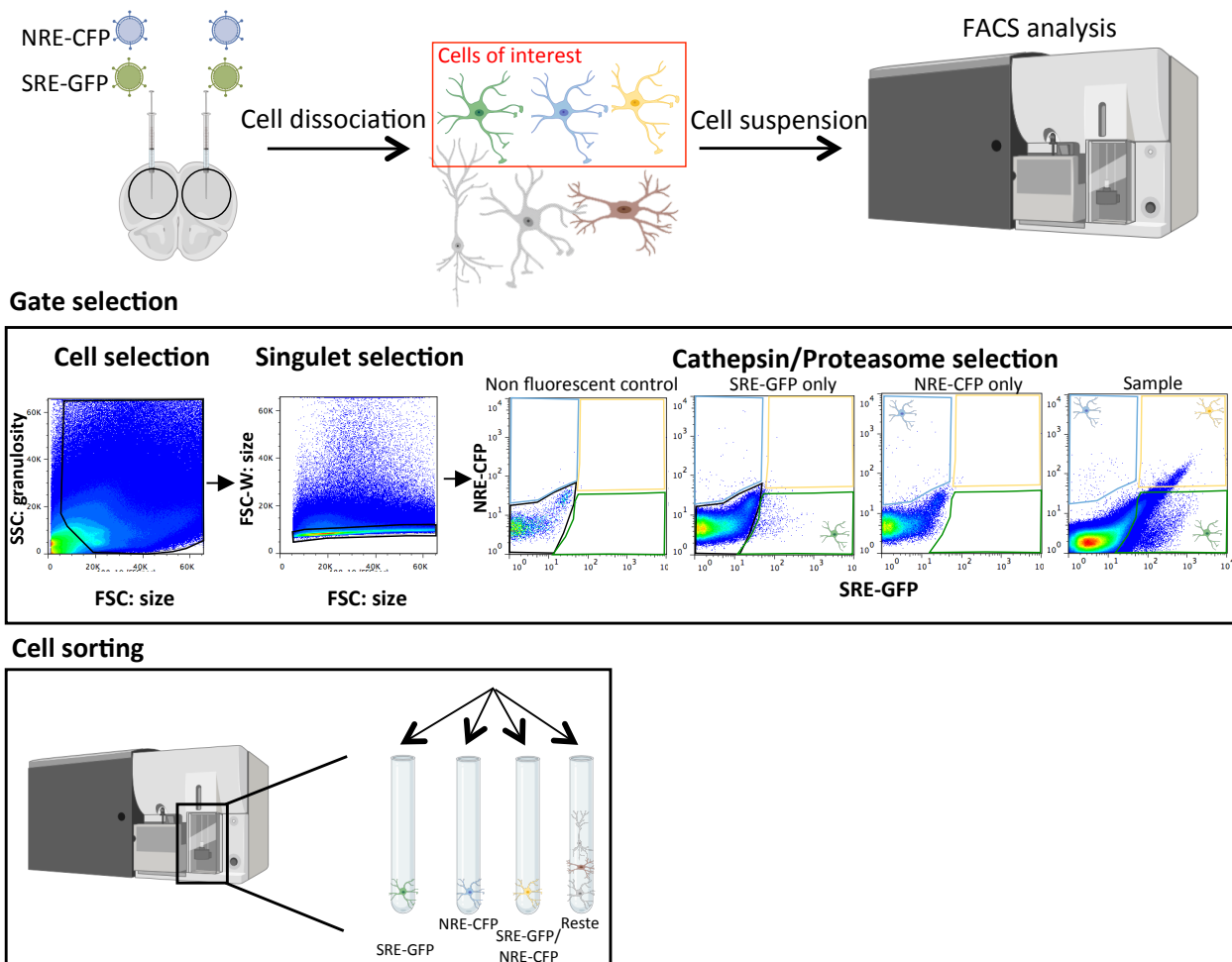


Figure 27. Tri des différentes populations d'astrocytes réactifs par FACS pour l'analyse en qPCR. Les cortex préfrontaux de souris injectées avec les lentivirus SRE-GFP et NRE-CFP ont été disséqués. Après dissociation, les suspensions cellulaires ont été injectées dans un flux de liquide isotonique à l'intérieur du cytomètre. La fluorescence de chaque cellule est ensuite mesurée individuellement. Les populations de cellules ont été identifiées en fonction de critères de taille (FSC, forward scatter) et de granulosity (SSC, side scatter). Parmi cette population, les singulets ont été sélectionnés. Les astrocytes des différentes populations, SRE-GFP⁺, NRE-CFP⁺ et SRE-GFP⁺/NRE-CFP⁺ ont ensuite été sélectionnés à l'aide d'échantillons contrôles non fluorescents et d'échantillons mono-marqués. Après détermination de ces paramètres (gardés constants pour tous les échantillons), la fluorescence de chaque cellule individuelle a été mesurée par le cytomètre afin de trier les cellules de chaque population dans des tubes séparés. Le tube nommé reste correspond aux astrocytes non marqués ainsi qu'aux autres types cellulaires du cerveau. L'expression des gènes de ces différentes populations a ensuite été analysée en qPCR.

1.4.2. Tri des populations d'astrocytes réactifs par FACS

Le tri a été réalisé sur la plateforme de cytométrie en flux (CEA, IRCM, collaboration avec Jan Baier et Nathalie Dechamps) à l'aide d'un trieur BD Influx (BD Biosciences). Les 3 populations d'astrocytes réactifs d'intérêts ont été déterminées en fonction de leurs tailles (FSC, forward scatter) et leurs granulosités (SSC, side scatter), ce qui permet d'exclure les débris et les cellules agrégées (**Figure 27**). Parmi cette population, nous avons exclus les doublets et donc sélectionné uniquement les singulets. Une suspension de cellules non marquées (contrôle non fluorescent) ou de PFC exprimant une seule protéine fluorescente (SRE-GFP seul ou NRE-CFP seul) ont été utilisés pour évaluer l'autofluorescence basale et régler le gain des détecteurs et la position des fenêtres. La GFP a été détectée à 530/40 nm (excitation à 488 nm) et la CFP à 450/50 nm (excitation à 408 nm). Ces réglages ont été conservés pour tous les échantillons (**Figure 27**). Les populations cellulaires suivantes ont été collectées séparément : astrocytes SRE-GFP⁺, astrocytes NRE-CFP⁺, astrocytes SRE-GFP⁺/NRE-CFP⁺ et cellules non fluorescentes c'est à dire les astrocytes non marqués et les autres populations cellulaires du cerveau (nommé échantillon « Reste »). Les cellules triées ont ensuite été centrifugées 5 min à 300 g, le surnageant a été jeté et les cellules ont été lysées dans 400 µl de TRIzol (Life technologies) puis congelées à -80°C avant d'en extraire l'ARN.

1.5. Analyses transcriptomiques sur astrocytes triés

1.5.1. Extraction d'ARN

Les cellules des 3 populations d'astrocytes précédemment triées ont été placées 5 min à température ambiante puis 400 µl de chloroforme a été ajouté au TRIzol pendant 3 min. Les échantillons ont été vortexés et centrifugés 15 min à 12 000 g. La phase aqueuse a été transférée dans un nouveau tube et un volume équivalent d'éthanol 70 % a été ajouté. L'extraction d'ARN a ensuite été réalisée avec des colonnes RNeasyMin (Qiagen, RNeasy micro kit, #74004) selon les recommandations du fournisseur. Pour éliminer une potentielle contamination par de l'ADN, un traitement à la DNase I a été réalisé sur la colonne. L'ARN a été élué dans 14 µl d'eau dé-ionisée sans RNase, préalablement déposée au centre de la colonne pendant 5 min. Après centrifugation, les échantillons ont été stockés à -80°C avant de procéder à l'amplification de l'ARN. Les échantillons « Reste » contenant les astrocytes non marquées et les autres types cellulaires n'ont pas été amplifiés mais une transcription inverse a été réalisée selon les recommandations du kit Superscript Vilo (Life technologies).

1.5.2. Amplification d'ARN

A ce stade, la concentration en ARN est trop faible pour réaliser une analyse en qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction). L'ARN a ainsi été amplifié en utilisant le kit Ovation PicoSLVTA system V2 (Nugen, #7102). Ce protocole consiste à synthétiser le premier brin d'ADNc puis le second avant de procéder à une purification de l'ADNc double brin. Enfin, une amplification de l'ADNc par SPIA (Single Primer Isothermal Amplification) est réalisée à l'aide de primers chimériques ARN/ADN, une ADN polymérase et la RNase H. L'ADNc amplifié est ensuite purifié en utilisant des

billes magnétiques (Agencourt RNAClean XP, Nugen technologies). La concentration des ADNc ainsi générés a été déterminée en utilisant le fluorimètre Qubit. Des concentrations de l'ordre de la dizaine de ng/μl ont été obtenues.

1.5.3. Analyse par RT-qPCR

Les échantillons provenant des cellules triées ont été dilués au 0.2 ng/μl dans de l'eau sans DNase/RNase. Les échantillons « Reste » dont la concentration moyenne était de 2000 ng/μl ont été dilués au 1/200. Les qPCR ont été réalisées en utilisant des couples d'oligonucléotides à 10 μM et du SYBR-Green (Bio-rad, #1725124). Les échantillons ont été déposés en duplicat ou triplicat dans des plaques 384 puits. Le programme de RT-qPCR suivant a été utilisé sur le thermocycleur (Bio-rad, CFX38) :

- Activation de la polymérase : 3 min à 95°C
- Cycles d'amplification (40x) : Fusion : 10 sec à 95°C et élongation : 30 sec à 60°C
- Dissociation : 65°C à 95°C avec une rampe de 0.5°C par étape.

Pour chaque gène, les Cq ont été mesurés et analysés avec le logiciel CFX Manager (Bio-rad). Afin de normaliser les niveaux d'ARNm entre les groupes, un ensemble de 7 gènes de ménage ont été analysés. Les meilleurs gènes de normalisation (*Actine* et *Eef1a1*) ont été sélectionnés suite à une analyse par la méthode Genorm (Vandesompele et al., 2002). Les Cq de chaque échantillon ont donc été normalisés par la moyenne géométrique de l'abondance des gènes *Actine* et *Eef1a1*. Les échantillons dont les gènes de normalisation étaient indétectables ont été exclus de l'analyse (n=1 WT et n=1 APP). De même, les échantillons dont les Cq étaient supérieurs à 35 cycles ont été considérés comme indétectables.

Les séquences d'oligonucléotides utilisées ont été construites comme décrits dans le tableau ci-dessous avec le logiciel Oligo (Table 3). Leur efficacité (>85%) et leur spécificité (courbe de fusion avec amplicon unique et contrôles négatifs RT- ou eau) ont été vérifiées. Un contrôle positif (homogénat total de cerveau de souris) a également été utilisé pour chaque gène.

Comme l'amplification des ARNm a tendance à introduire de la variabilité, nous avons utilisé le test statistique de Grubbs afin de détecter les valeurs aberrantes par gène, appelées outliers. Ces dernières ont été exclues (1 maximum par gène et par groupe).

Gènes	Amorce sens	Amorce anti-sens
<i>Actine</i>	AGAGGGGAAATCGTGCGTGAC	CGATAGTGATGACCTGACCGT
<i>Eef1a1</i>	CTACCCTCCACTTGGTCGCTT	GCAACTGTCTGCCTCATGTCAC
<i>Gfap</i>	ACGACTATCGCCGCCAACT	GCCGCTCTAGGGACTCGTTC
<i>Slc1a2</i>	GGCAATCCCAAACCTCAAGAAGC	GTCAGTGTCTGAATCTGCTGGAAAC
<i>Serpina3n</i>	CAACCTTACAGGCCAACCCAT	GGGCACCAAGTAGTCCTAGATGCT
<i>Aqp4</i>	TTGGACCCGCAGTTATCATG	GCGACGTTTGAGCTCCACAT
<i>ApoE</i>	CTGAACCGCTTCTGGGATTACCTG	CATAGTGTCTCCATCAGTGCCGTC
<i>H2-D1</i>	CCCACTCGATGCGGTATT	CGGCTCATATCTCGGATTCT
<i>Ghul</i>	GGGCTACTTTGAAGACCGTC	TTCGTGCGCTGTTTCGT
<i>Cd14</i>	GCCAGGCCAGGACTCAACT	GCCAGGCCACAAACGTACC
<i>CtsS</i>	GGCATGAACGAT ATGGGA G	TCAGGCAATGTCCGATTAGA
<i>CtsZ</i>	CGGGTCGGGTCAAGAGGT	CTCGCCAACAGCAACATCAG
<i>Kcnj10</i>	AGAGGGCCGAGACGAT	TTGACCTGGTTGAGCCGAATA
<i>Gja1</i>	GAGATGCACCTGAAGCAGATTGAA	GATATTCAGAGCGAGAGACACCAA
<i>Tm4sf1</i>	AGCCAGGCCAGGACTCAACT	GCCAGGCCACAAACGTACC
<i>Ube2k</i>	TTCGTGTGCTCGGGTCTGAA	CCGCTGCCACCTCTTCCTC
<i>H2T23</i>	AGCCAGGCCAGGACTCAACT	GCCAGGCCACAAACGTACC

<i>Gjb6</i>	GGCCGAGTTGTGTTACCTGCT	TCTCTTTCAGGGCATGGTTGG
-------------	-----------------------	-----------------------

Tableau 3. Séquence des oligonucléotides utilisés pour l'analyse par qPCR.

1.6. Quantification des activités de protéolyse par FACS

1.6.1. Marquage avec les sondes fluorescentes

L'activité du protéasome et des cathepsines, enzymes lysosomales, a été mesurée à l'aide de sondes fluorescentes fonctionnelles dont l'activité est proportionnelle à la fluorescence émise mesurée par FACS. La sonde protéasome (UbiQ Bio BV, UbiQ-018) émet à 530/40 nm (Berkers et al., 2007) et la sonde pan-cathepsine (iABP, Vergent Bioscience, #40200), mesurant l'activité des cathepsines B, L, S et X, émet à 670/20 nm (Withana et al., 2016). Pour mesurer l'activité des cathepsines et du protéasome dans les 3 populations d'astrocytes réactifs, le protocole de dissociation des cellules précédemment décrit a été appliqué et chacun des cerveaux a été analysé individuellement. Après dissociation et déplétion de la myéline, les cellules ont été re-suspendues dans 0.5 % de tampon PNB (Perkin Elmer, #FP1020) pendant 30 min et incubées pendant 1 h dans 1 μ M de la sonde cathepsine et 200 nM de la sonde protéasome. Les cellules ont été centrifugées 5 min à 300 g et re-suspendues dans 400 μ l d'HBSS.

1.6.2. Analyse par FACS

Les cellules marquées avec les sondes fluorescentes ont été analysées par FACS à l'aide du trieur BD Influx. Dans le but de pouvoir mesurer l'expression de ces sondes dans les différentes populations d'astrocytes réactifs avec des détecteurs compatibles, le promoteur permettant de mesurer l'activation de la voie STAT3 a été associé à la protéine fluorescente Tomato (SRE-Tomato) et inclus dans un vecteur lentiviral pseudotypé Mokola. Le vecteur NRE-CFP reste inchangé. SRE-Tomato a donc été détecté à 579/34 nm (excitation à 561 nm), NRE-CFP à 450/50 nm (excitation à 408 nm), la sonde cathepsine à 670/20 nm (excitation à 640 nm) et la sonde protéasome à 530/40 nm (excitation à 488 nm). Les échantillons ont été analysés sur le logiciel Flowjo (version 7.6). Les cellules d'intérêts ont été sélectionnées sur des critères de taille et granulosité puis seuls les singulets ont été sélectionnés (**Figure 28**). L'ensemble des cellules simple-positives protéasome et cathepsine ainsi que les cellules double-positives protéasome/cathepsine ont été sélectionnés à l'aide de suspensions de cellules non marquées (contrôle non fluorescent) ou d'échantillons mono-marqués, soit protéasome, soit cathepsine (**Figure 28**). Une fois cette stratégie de sélection réalisée, l'expression des populations d'astrocytes réactifs SRE-Tomato⁺ et NRE-CFP⁺ ont été étudiées dans l'ensemble des cellules dont l'activité de protéolyse est active. Des contrôles mono-fluorescents ont été réalisés afin de combiner ces 4 paramètres gardés constants pour tous les échantillons. Ainsi, les pourcentages de cellules Protéasome⁺/SRE-Tomato⁺; Protéasome⁺/NRE-CFP⁺; Cathepsine⁺/SRE-Tomato⁺; Cathepsine⁺/NRE-CFP⁺; Protéasome⁺/Cathepsine⁺/SRE-Tomato⁺; Protéasome⁺/Cathepsine⁺/NRE-CFP⁺ ont été quantifiés. La médiane de fluorescence des sondes dans chacune des populations d'astrocytes réactifs a également été mesurée. Une stratégie de sélection inverse dans laquelle les astrocytes SRE-Tomato⁺ et NRE-CFP⁺ sont sélectionnés a également été appliquée et a permis d'étudier l'activité des sondes dans chacune des populations

(pourcentage d'astrocytes et médiane de fluorescence des sondes). La présence d'une population autofluorescente importante, qui se superpose avec les cellules SRE-Tomato⁺/NRE-CFP⁺ due à la combinaison de 4 canaux de couleurs, n'a pas permis d'isoler une population d'astrocytes réactifs doubles positifs SRE-Tomato⁺/NRE-CFP⁺ pour la suite de l'analyse.

Une étude de clusterisation de type t-SNE (t-distributed stochastic neighbor embedding) a également été réalisée sur Flowjo (version 10.6.1) en combinant les données collectées pour les 6 souris APP. Cette méta-analyse a permis de réaliser une étude de clusterisation sur 430 000 cellules protéasome⁺, 145 904 cellules cathepsine⁺ et enfin 6 971 cellules protéasome⁺/cathepsine⁺. L'analyse automatique « opt-SNE » de Flowjo (Belkina et al., 2019) a été utilisée avec les paramètres par défaut suivants :

- Itération : 500
- Perplexité : 30
- Algorithme KNN : exact
- Algorithme de gradient : Barnes-Hut.

Les résultats ont été présentés sous forme de graphiques t-SNE. Un codage en fausses couleurs de l'intensité de fluorescence de chacune des sondes a été appliqué sur les graphiques.

1.7. Statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM (Standard error of the mean). Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Statistica (Statsoft) et Graphpad Prism. Afin de vérifier les conditions d'applications de tests paramétriques, la normalité des résidus via le test de Shapiro-Wilk et l'homoscédasticité via le test de Levene ont été testés pour chaque analyse. Le test t de Student (pour des échantillons indépendants) ou le test t apparié (pour des échantillons dépendants) a été réalisé pour la comparaison de 2 groupes. Une ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc de Tukey a été appliquée pour la comparaison de 3 groupes. Une ANOVA à deux facteurs suivi d'un post-hoc de Tukey a été réalisée pour l'expérience de mesure du nombre d'astrocytes en histologie et la mesure de l'expression de gènes en RTqPCR. Dans le cas de non respect d'une des deux conditions d'application, des tests non paramétriques ont été réalisés. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer 2 groupes indépendants et le test de Kruskal-Wallis suivi d'un post-hoc de Dunn a été appliqué pour comparer de multiples échantillons indépendants. Les différences ont été considérées comme significatives pour une p-value $\leq 0,05$.

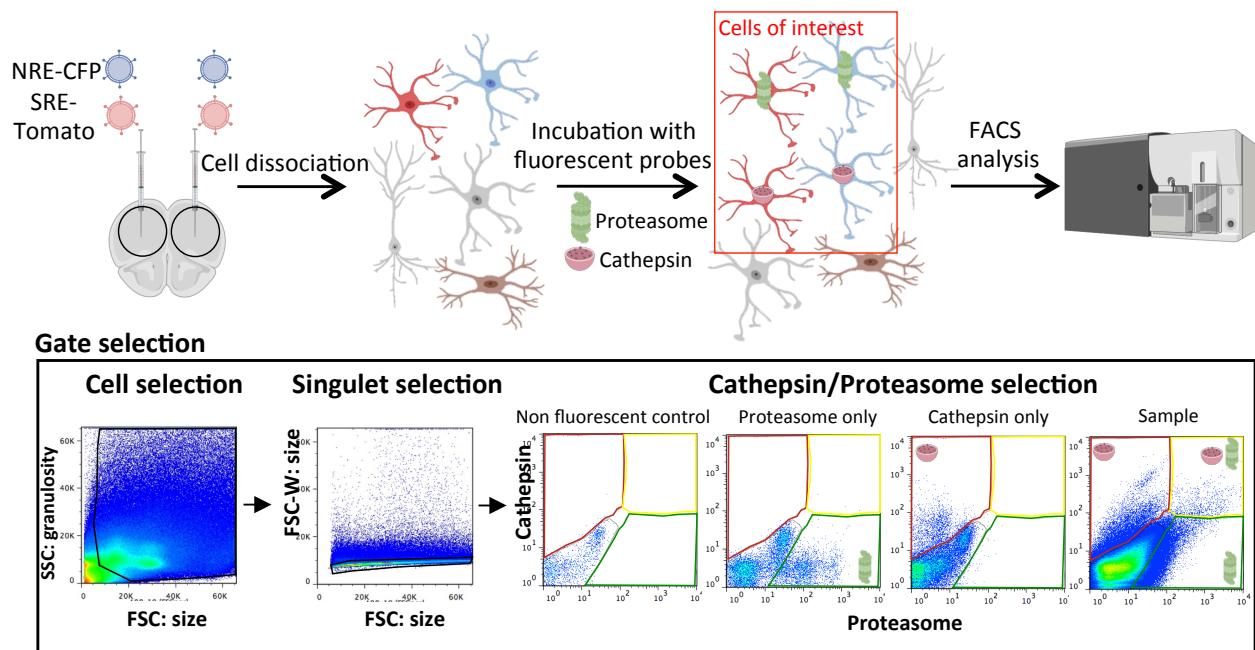


Figure 28. Analyse des activités de protéolyse par FACS. Les cortex préfrontaux de souris injectées avec les lentivirus SRE-Tomato et NRE-CFP ont été disséqués. Après dissociation, les cellules ont été incubées avec les sondes fluorescentes permettant de mesurer l'activité des cathepsines et du protéasome. Les suspensions cellulaires ont été injectées dans un flux isotonique à l'intérieur du cytomètre. La fluorescence de chaque cellule est ensuite mesurée individuellement. Les cellules ont été identifiées en fonction de critères de taille et de granulosité. Parmi cette population, les singlets ont été sélectionnés. Les cellules simple-positives cathepsine et protéasome ainsi que les cellules double-positives cathepsine/protéasome ont ensuite été sélectionnées à l'aide d'échantillons contrôles non fluorescents (non-injectés) et d'échantillons mono-marqués avec la sonde cathepsine seule ou la sonde protéasome seule. Cette stratégie de sélection nous permet ainsi d'étudier la proportion des populations d'astrocytes réactifs SRE-Tomato⁺ et NRE-CFP⁺ (sélectionnées avec la même stratégie que dans la figure 2) dans l'ensemble des cellules dont l'activité de protéolyse est active.

2. Validation des outils rapporteurs des voies de signalisation, SRE-GFP et NRE-CFP

Pour pouvoir suivre l'activité de cascades de signalisation d'intérêt dans le contexte de la réactivité astrocytaire, nous avons généré des systèmes rapporteurs de voies de signalisation intégrés dans des vecteurs lentiviraux. Ces rapporteurs sont composés de cassettes individuelles contenant des motifs nucléotidiques de réponse à un facteur de transcription, associés à un promoteur minimal en amont d'une séquence codant une protéine fluorescente (**Figures 26 et 29**, paragraphe II.1 du matériel et méthodes). Ici, nous avons décidé de suivre l'activation de la voie STAT3, que nous avons montré comme ayant un rôle clé dans la réactivité astrocytaire au cours de la MA (**Articles 1 et 2**) (Ben Haim, et al., 2015b), à l'aide d'un rapporteur appelé SRE-GFP (SRE pour STAT3 responsive element). Nous avons également généré un rapporteur pour la voie NF- κ B, qui est activée dans les astrocytes réactifs dans des modèles MA (Lian et al., 2015b; Zhang et al., 2017), à l'aide du rapporteur NRE-CFP (NRE pour NF- κ B responsive element) (**Figures 26 et 29**).

2.1. Tropisme

Les rapporteurs SRE-GFP et NRE-CFP ont été intégrés dans des vecteurs lentiviraux pseudotypés par l'enveloppe Mokola. L'enveloppe Mokola favorise l'infection préférentielle des astrocytes lorsqu'elle est combinée au promoteur ubiquitaire PGK. En effet, ces vecteurs infectent préférentiellement les astrocytes GFAP⁺ mais pas les microglies Iba1⁺ et les neurones NeuN⁺ (**Figure 30A**). Plus précisément, 90% des cellules infectées sont des astrocytes (données non montrées). Ils sont classiquement utilisés dans le laboratoire et ne provoquent pas de neuroinflammation majeure (données non montrées, (Escartin et al., 2006; Ben Haim et al., 2015b)). Les rapporteurs SRE-GFP et NRE-CFP ont été injectés dans le PFC de souris WT âgées de 12 mois. Deux mois après injection, les cerveaux ont été analysés en immunofluorescence. L'expression de la GFP (SRE-GFP) et CFP (NRE-CFP) est détectée dans les astrocytes GFAP⁺, confirmant le tropisme astrocytaire des rapporteurs, même quand le promoteur PGK est remplacé par un promoteur SRE ou NRE (**Figure 30A, B**).

2.2. Sensibilité du rapporteur SRE-GFP à la voie de signalisation STAT3

Un co-marquage avec STAT3 a été réalisé sur les souris WT précédentes. L'accumulation nucléaire de STAT3 est un témoin de l'activation de la voie JAK2-STAT3 (Ben Haim et al., 2015b; Tyzack et al., 2014). Les cellules GFP⁺ co-expriment STAT3, confirmant l'activation de cette voie dans les astrocytes du PFC (**Figure 30C**).

Afin de confirmer la sensibilité du rapporteur SRE-GFP à la voie JAK2-STAT3, la voie a été activée dans les astrocytes du striatum de souris WT par un LV pseudotypé Mokola codant pour JAK2ca (**Articles 1 et 2**). Cette construction a été co-injectée avec le rapporteur ou LV SRE-GFP dans un hémisphère. L'autre hémisphère contrôle a été co-injecté avec le rapporteur SRE-GFP et un LV pseudotypé Mokola codant pour la protéine LacZ (**Figure 30D**). L'activation de la voie par le LV-JAK2ca entraîne une augmentation des niveaux de GFP par rapport au groupe contrôle, confirmant l'activation

du rapporteur. Les cellules GFP⁺ co-expriment bien la GFAP (**Figure 30E**). L'augmentation des niveaux de GFP est également détectable en FACS sur des cellules dissociées à partir de striatum injecté avec le LV-JAK2ca (**Figure 30F**). Des expériences équivalentes sont en cours avec le rapporteur NRE-CFP mais elles impliquent une optimisation de la détection des intermédiaires de la voie NF- κ B.

Ainsi, les rapporteurs SRE-GFP et NRE-CFP ciblent spécifiquement les astrocytes et le rapporteur SRE-GFP est bien induit lorsque la voie de signalisation JAK2-STAT3 est activée, confirmant ainsi sa sensibilité. Ces outils rapporteurs sont donc adaptés pour une étude des différentes classes d'astrocytes réactifs *in situ* dans le PFC de souris APP.

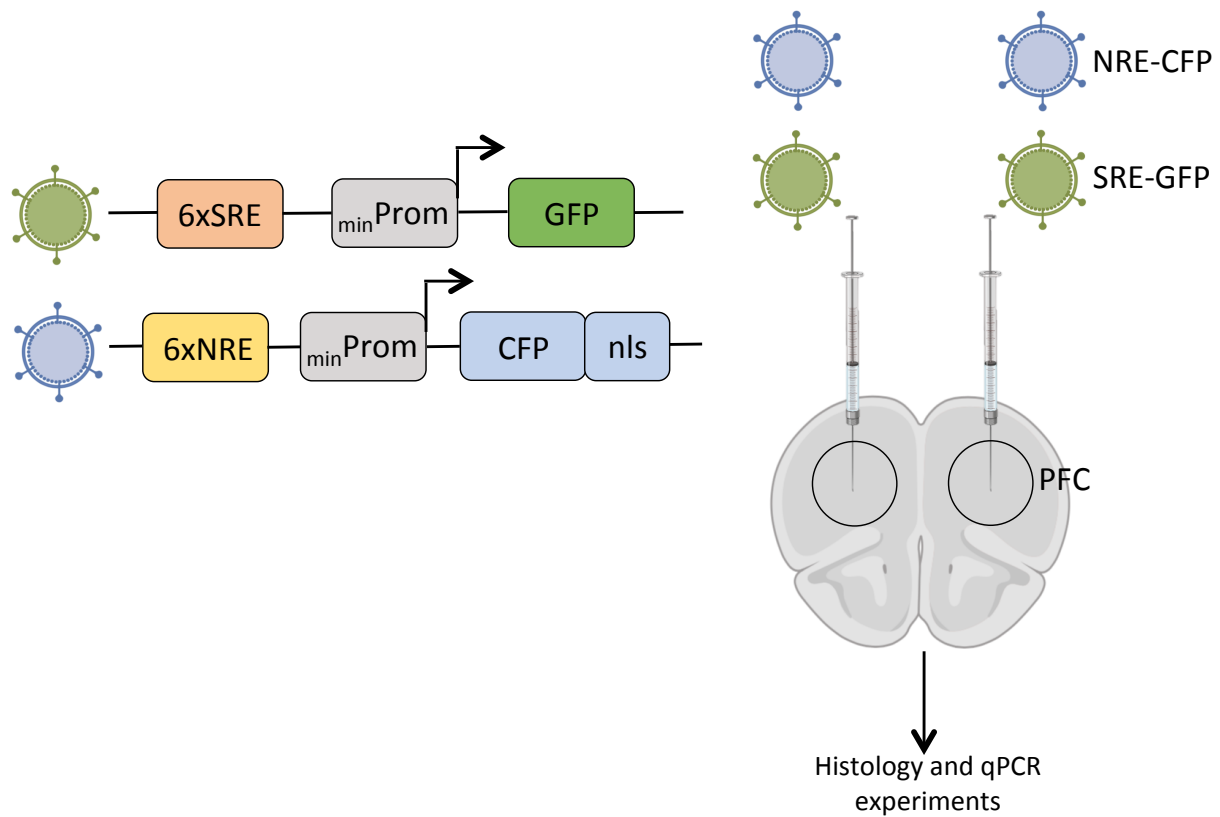


Figure 29. Systèmes rapporteurs des voies de signalisation STAT3 et NF- κ B. Les rapporteurs des voies de signalisation ont été intégrés dans des vecteurs lentiviraux et sont composés de cassettes individuelles contenant des motifs nucléotidiques de réponse à un facteur de transcription associé à un promoteur minimal en amont d'une séquence codante une protéine fluorescente. SRE-GFP permet ainsi de suivre l'activation de la voie STAT3 et NRE-CFP l'activation de la voie NF- κ B. Ces constructions ont été injectées dans le cortex préfrontal de souris mâles WT ou APP et ont été utilisées pour des expériences d'histologie et de qPCR sur astrocytes triés. *SRE: STAT3 responsive element; NRE: NF- κ B responsive element; nls: nuclear localization signal; PFC: Prefrontal cortex.*

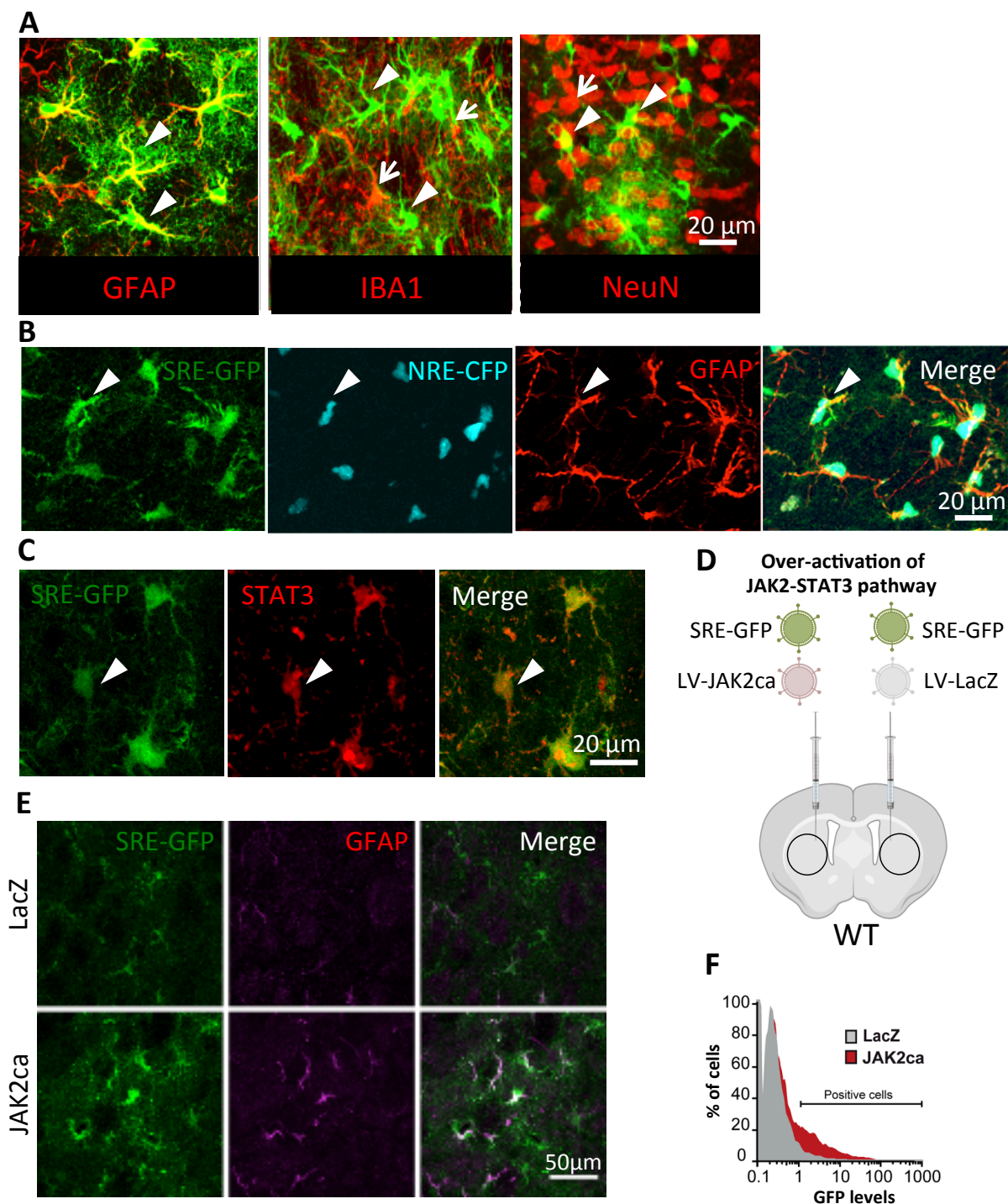


Figure 30. Les rapporteurs des voies de signalisation SRE-GFP et NRE-CFP infectent spécifiquement les astrocytes du PFC et le rapporteur SRE-GFP est sensible à l'activation de la voie STAT3. **A.** Les vecteurs lentiviraux pseudotypés Mokola et contenant un promoteur ubiquitaire PGK ont un tropisme astrocytaire. Ils infectent les astrocytes (vert) GFAP⁺ (rouge) mais pas d'autres types cellulaires comme les microglies Iba1⁺ ou les neurones NeuN⁺ (rouge). Les têtes de flèches montrent un exemple d'astrocytes GFP⁺ alors que les flèches illustrent des microglies ou neurones. **B.** Les cellules GFP⁺ (SRE-GFP, vert) et CFP⁺ (NRE-CFP, cyan) co-expriment le marqueur astrocytaire GFAP (rouge). **C.** Les cellules GFP⁺ co-expriment STAT3, confirmant l'induction de la voie dans les astrocytes du PFC. **D.** La voie JAK2-STAT3 a été activée, dans le striatum de souris WT, par un LV codant pour une forme constitutivement active de JAK2, appelé JAK2ca (Articles 1 et 2), en présence du rapporteur SRE-GFP pour voir si il était sensible à l'activation de la voie. L'hémisphère contrôle a été injecté avec le vecteur rapporteur SRE-GFP et un lentivirus codant pour LacZ. **E, F.** L'activation de la voie par le LV-JAK2ca entraîne une activation du rapporteur SRE-GFP visible par une augmentation des niveaux de GFP en histologie (vert, E) dans les astrocytes GFAP⁺ (magenta) ainsi qu'en FACS (F) sur des cellules dissociées par rapport à un groupe contrôle injecté avec le LV-LacZ. *LV: lentivirus.*

3. Hétérogénéité des voies de signalisation STAT3 et NF- κ B dans les astrocytes du cortex préfrontal

Afin d'étudier l'activation des voies de signalisation STAT3 et NF- κ B, les rapporteurs SRE-GFP et NRE-CFP ont été injectés dans le PFC de souris APP et WT âgées de 12 mois. Deux mois après injection, l'expression des protéines rapportrices fluorescentes a été analysée par histologie (**Figure 31A**).

L'analyse histologique montre que les voies STAT3 et NF- κ B sont bien activées dans les astrocytes (co-localisation avec la GFAP, **Figure 31A, B**) du PFC de souris WT et APP. Cependant, l'activation de ces voies est hétérogène puisque trois classes d'astrocytes réactifs sont observées : SRE-GFP⁺ (vert), NRE-CFP⁺ (cyan, nucléaire) et SRE-GFP⁺/NRE-CFP⁺ (vert/cyan) (**Figure 31B**). Le nombre d'astrocytes dans chacune des classes a été quantifié à l'aide d'une macro développée sur Image J. La quantification montre que les deux voies de signalisation sont induites à des niveaux différents dans les souris WT et APP (**Figure 31C**). La présence de cellules marquées en nombre conséquent chez les souris WT s'explique par le fait que ces voies de signalisation ont également un rôle en conditions physiologiques, en dehors de toute réactivité des astrocytes. Cependant, le nombre d'astrocytes dans chacune des catégories tend à être plus élevé chez les souris APP ($p = 0.055$ pour l'effet du génotype en ANOVA à 2 facteurs et absence d'effet de l'interaction entre le génotype et les rapporteurs) (**Figure 31C**). La quantification normalisée du nombre d'astrocytes par catégorie montre des résultats identiques (**Figure 31D**).

Le nombre normalisé d'astrocytes réactifs double SRE-GFP⁺/NRE-CFP⁺ dans les souris WT (**Figure 31F**) est de seulement 20% dans le PFC. Au contraire, lorsque les souris WT sont injectées dans le PFC avec des LV de promoteur ubiquitaire et identique PGK, PGK-GFP et PGK-Tomato (**Figure 31E**), le nombre normalisé d'astrocytes PGK-GFP⁺/PGK-Tomato⁺ est de 90% (**Figure 31F**). Ceci montre que les astrocytes dans la zone d'infection sont co-infectés à plus de 90% par les 2 virus et contiennent donc les 2 rapporteurs. Ainsi, l'expression différentielle des protéines rapportrices GFP et CFP n'est pas due à l'absence des rapporteurs causés par une infection stochastique par l'un ou l'autre des rapporteurs mais bien un effet de régulation du promoteur sensible à l'activation de la cascade. En d'autres termes, si une des deux protéines rapportrices GFP ou CFP n'est pas exprimée, il s'agira bien d'un effet lié à l'inactivité du promoteur et non une absence d'infection par le rapporteur dans cette cellule.

Ainsi, cette étude révèle une hétérogénéité de signalisation puisque des astrocytes réactifs voisins situés dans un même environnement ne présentent pas les mêmes voies activées. Nous avons étudié si ces trois populations avaient une localisation ou répartition spécifique par rapport à leur environnement (vaisseaux, plaques amyloïdes) mais nous n'avons pas identifié de telles « règles topographiques ». Néanmoins, de façon qualitative, nous avons observé que les astrocytes simple SRE-GFP⁺ et simple NRE-CFP⁺ semblent être regroupés en « clones » de cellules de même classe (données non montrées).

Après avoir montré l'existence de différentes classes d'astrocytes réactifs en terme de signalisation, nous avons caractérisé le profil transcriptionnel de ces classes.

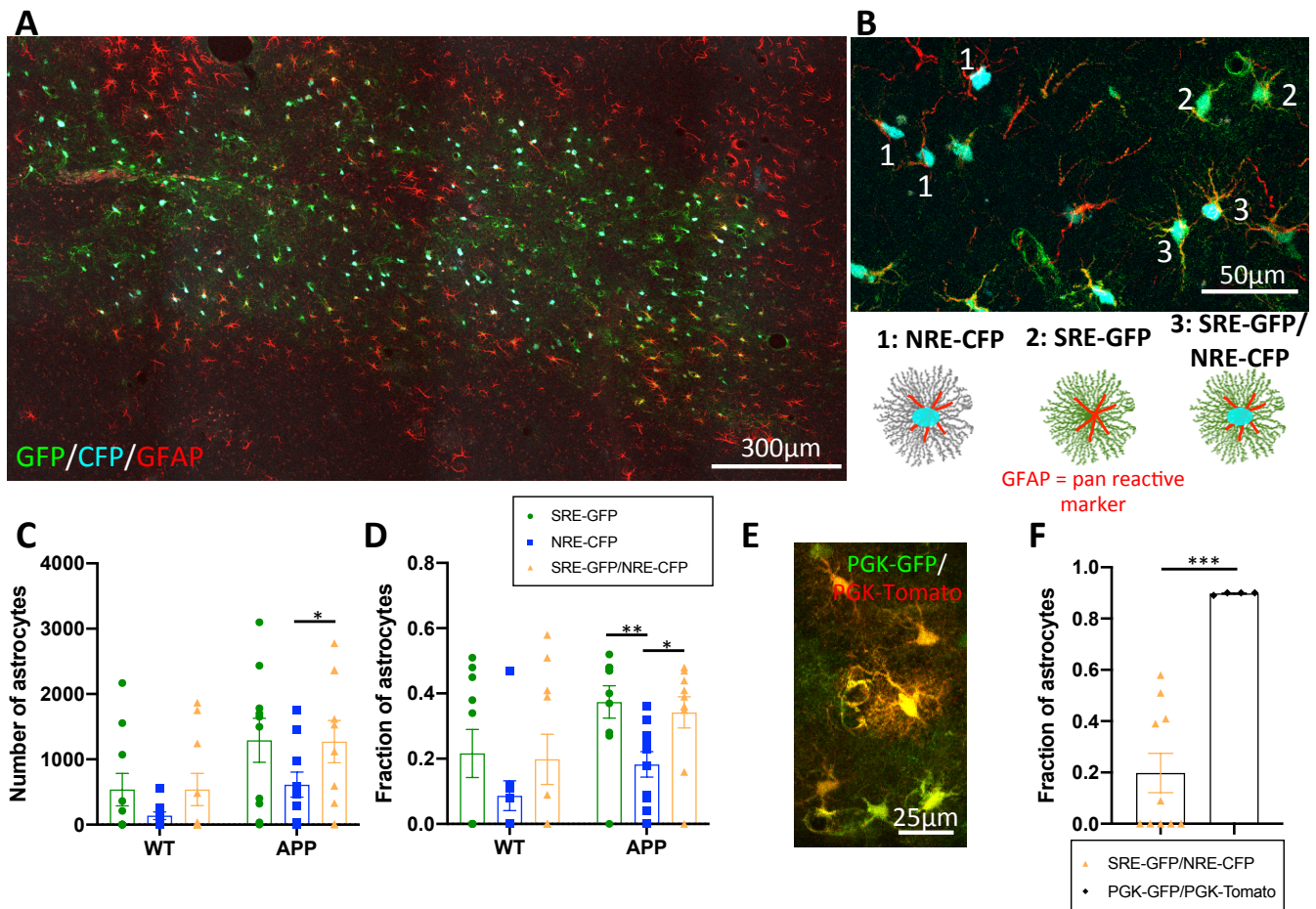


Figure 31. L'activation des voies de signalisation STAT3 et NF- κ B est hétérogène dans les astrocytes du PFC de souris APP. **A.** Image confocale à faible grossissement d'astrocytes du PFC de souris APP injectées avec les rapporteurs SRE-GFP et NRE-CFP. **B.** A fort grossissement, 3 classes d'astrocytes réactifs se distinguent: SRE-GFP⁺ (vert), NRE-CFP⁺ (noyau cyan) et SRE-GFP⁺/NRE-CFP⁺. Les astrocytes réactifs sont identifiés par l'expression du marqueur de réactivité GFAP (rouge). **C.** La quantification de ces 3 classes d'astrocytes réactifs chez les souris WT et APP montre que les voies de signalisation JAK-STAT3 et NF- κ B sont induites dans les astrocytes de souris APP mais à différents niveaux, confirmant l'hétérogénéité de signalisation. **D.** La quantification en nombre normalisé par rapport au nombre d'astrocytes total par souris montre des résultats similaires. ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-hoc de Tukey. **E.** Image confocale d'astrocytes du PFC de souris injectées avec deux virus de même promoteur et ciblant les astrocytes, PGK-GFP et PGK-Tomato. **F.** Quantification normalisée du nombre d'astrocytes co-exprimant les rapporteurs SRE-GFP et NRE-CFP ou co-exprimant les lentivirus PGK-GFP et PGK-Tomato. Cette expérience montre que deux virus de même promoteur (PGK) conduisent à une co-expression proche de 100% des protéines rapportrices alors que deux virus de promoteur différents (rapporteurs SRE et NRE) induisent une co-expression de seulement 20% environ. *t*-test.

4. Hétérogénéité moléculaire dans les classes de signalisation d'astrocytes réactifs du cortex préfrontal

Afin d'étudier le profil transcriptionnel des classes d'astrocytes réactifs, des souris APP et WT âgées de 12 mois ont été injectées dans le PFC avec les rapporteurs SRE-GFP et NRE-CFP. Les cellules correspondant à chacune des classes SRE-GFP⁺, NRE-CFP⁺ et SRE-GFP⁺/NRE-CFP⁺ ont été triées par cytométrie, l'ARN a été extrait puis amplifié avant d'étudier le profil d'expression de gènes cibles en qPCR (Figures 27 et 29). En moyenne, le nombre de cellules triées par échantillon est de 4781 pour les astrocytes SRE-GFP⁺, 479 pour les astrocytes NRE-CFP⁺ et 193 pour les astrocytes SRE-GFP⁺/NRE-CFP⁺.

Nous avons d'abord étudié des gènes liés à la réactivité avec des marqueurs de réactivité ubiquitaires comme *Gfap* et *Serpina3n* et des marqueurs décrits comme associés aux astrocytes réactifs de type « A1 » (*H2-D1*, *H2-T23*) et « A2 » (*Cd14*, *Tm4sf1*) (Liddelow et al., 2017). D'autres gènes sont liés aux fonctions homéostatiques des astrocytes. Des gènes impliqués dans le métabolisme du glutamate comme *Glu1*, codant pour la glutamine synthétase (GS) et catalysant la conversion du glutamate en glutamine ou *Slc1a2*, codant pour un transporteur sodium-dépendant du glutamate (GLT1) ont été étudiés. Nous avons également analysé l'expression de gènes liés à l'homéostasie ionique comme *Aqp4* (aquaporin-4), un canal impliqué dans l'homéostasie de l'eau à l'interface sang-cerveau et *Kcnj10*, un gène codant pour le canal potassique rectifiant entrant Kir4.1 impliqué dans le maintien des niveaux de potassium entre le milieu extracellulaire et intracellulaire. Certaines connexines comme *Gjb6* codant pour la connexine 30 (Cx30) ou *Gja1* codant pour la Cx43 ont aussi été étudiés. Il s'agit de composants structurels des jonctions gap reliant le cytoplasme des astrocytes adjacents en réseau. Nous avons également regardé l'expression de gènes liés à la maladie d'Alzheimer comme l'apolipoprotéine E (*ApoE*) impliquée dans le transport des lipides et dont l'allèle ε4 du gène est un facteur de risque majeur de la maladie. Finalement, des gènes liés à la protéostasie, fonction étudiée dans la suite de notre étude ont été analysés. En effet, une analyse transcriptomique de l'équipe sur des astrocytes rendus réactifs par activation de la voie JAK2-STAT3 par JAK2ca dans les souris WT a été réalisée et a révélé des changements d'expression importants des gènes associés au protéasome et aux lysosomes dans les astrocytes réactifs (Abjean et al, en préparation). Nous avons ainsi analysé l'expression de gènes identifiés dans cette étude comme la cathepsine S (*Ctss*), la cathepsine Z (*Ctsz*) et l'ubiquitine ligase *Ube2k*.

Dans les souris APP, ces gènes ont différents profils d'expression entre les 3 classes d'astrocytes réactifs. Nous distinguons 3 catégories de gènes : ceux significativement voire exclusivement exprimés dans les cellules SRE-GFP⁺ (Figure 32A), d'autres exprimés de manière identique entre les astrocytes SRE-GFP⁺ et NRE-CFP⁺ mais indétectables dans les doubles SRE-GFP⁺/NRE-CFP⁺ (Figure 32B) et enfin des gènes exprimés de façon équivalente dans les 3 classes d'astrocytes réactifs (Figure 32C).

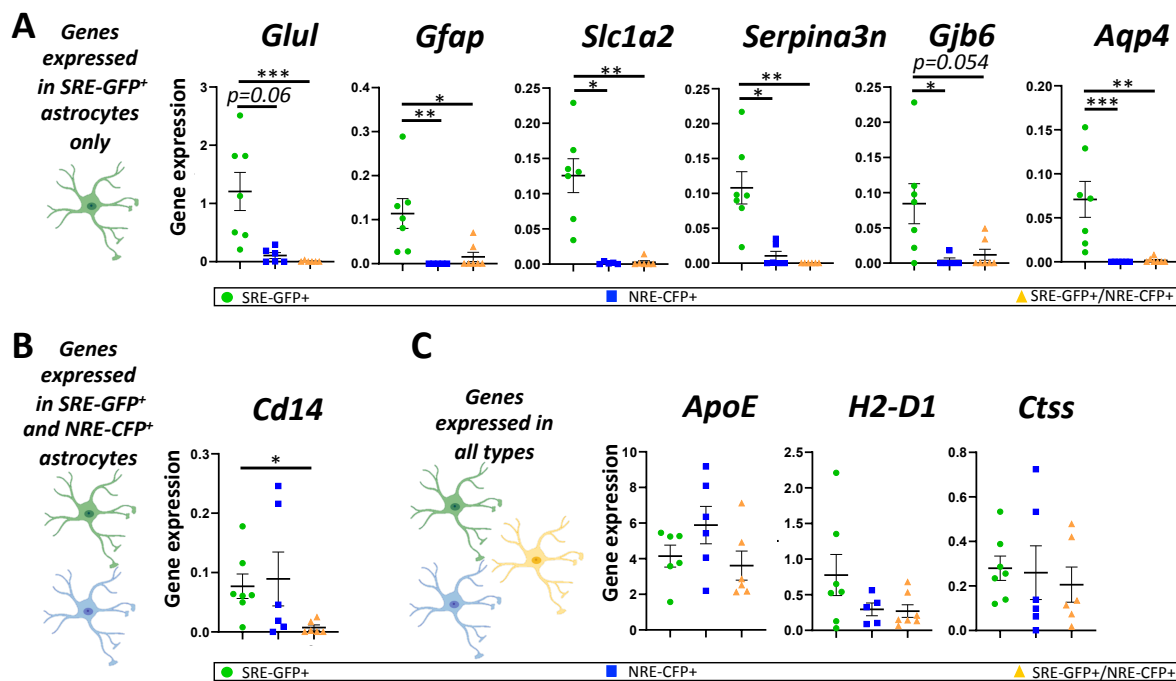


Figure 32. Dans les souris APP, l'activation différentielle des cascades est associée à des profils moléculaires différents. Le PFC de souris APP injectées avec les rapporteurs SRE-GFP et NRE-CFP a été extrait, dissocié et les cellules ont été triées avant de procéder à des RTqPCR sur chacune des 3 populations d'astrocytes. L'étude de différents gènes montre que certains sont significativement plus exprimés dans les astrocytes SRE-GFP⁺ (A). Ces gènes sont liés à la réactivité (*Gfap*, *Serpina3n*), aux fonctions homéostatiques des astrocytes (*Glul*, *Slc1a2*, *Aqp4*) ou à leur organisation en réseau (*Gjb4*). D'autres gènes comme *Cd14*, lié à la réactivité, sont exprimés de manière équivalente entre les astrocytes SRE-GFP⁺ et NRE-CFP⁺ (B). Enfin, les gènes exprimés à des niveaux identiques entre les trois populations d'astrocytes réactifs (C) sont liés à la réactivité (*H2-D1*), à la maladie d'Alzheimer (*ApoE*) ou encore liés aux fonctions de protéolyse (*Ctss*). Expression normalisée par rapport à la moyenne géométrique d'*Eef* et *Actine*. Pour la majorité des gènes: test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple de Dunn. Sinon, ANOVA suivi du post-hoc de Tukey. Dans chaque catégorie, les gènes sont ordonnés de façon décroissante par rapport à leur niveau d'expression relative.

La validation par immunohistochimie de l'expression différentielle de ces gènes dans les 3 classes d'astrocytes réactifs est en cours.

Certains des gènes analysés en RT-qPCR présentent de trop faibles niveaux d'expression pour conclure sur une éventuelle expression différentielle. C'est le cas de *Kcnj10*, *Ube2k*, *Gja1*, *H2-T23*, *Ctsz*, et *Tm4sf1* (données non montrées).

Ainsi, chaque classe de signalisation d'astrocytes réactifs a un profil moléculaire spécifique (**Figure 33**), suggérant que chaque combinaison de cascades de signalisation régle un programme transcriptionnel unique.

L'étude de ces gènes a également été réalisée avec les souris WT (**Figure supplémentaire 1**). Certains gènes comme *ApoE*, *H2-D1* et *Ctss* sont exprimés par les 3 classes d'astrocytes, comme dans les souris APP. Cependant, certains gènes sont exprimés différemment dans les astrocytes de souris WT par rapport aux souris APP. Par exemple, *Glul* est exprimé par tous les astrocytes WT alors qu'il n'est exprimé que par les astrocytes SRE-GFP⁺ dans les souris APP. *Cd14* est exprimé uniquement par les astrocytes WT NRE-CFP⁺ alors qu'il est aussi présent dans les astrocytes SRE-GFP⁺ chez les souris APP. Enfin, le marqueur de réactivité ubiquitaire, *Serpina3n*, n'est détectable dans aucune classe d'astrocyte des souris WT (**Figure supplémentaire 1**). La différence d'expression de *Serpina3n* entre les souris WT et APP n'est pas significative mais son absence d'expression chez les souris WT suggère une induction de ce gène dans les astrocytes réactifs de souris APP (données non montrées). Avec un profil d'expression des gènes plus variable chez les souris WT, aucune différence significative n'a été montrée entre les deux groupes de souris WT et APP (ANOVA à 2 facteurs, effet génotype > 0.05, données non montrées). Ces résultats suggèrent que les 3 classes de signalisation d'astrocytes sont déjà établies en conditions basales.

Après avoir montré que l'activation des différentes classes de signalisation, STAT3 et NF-κB dans les astrocytes du PFC était hétérogène et associée à différents profils moléculaires, nous avons étudié certaines caractéristiques fonctionnelles de ces classes.

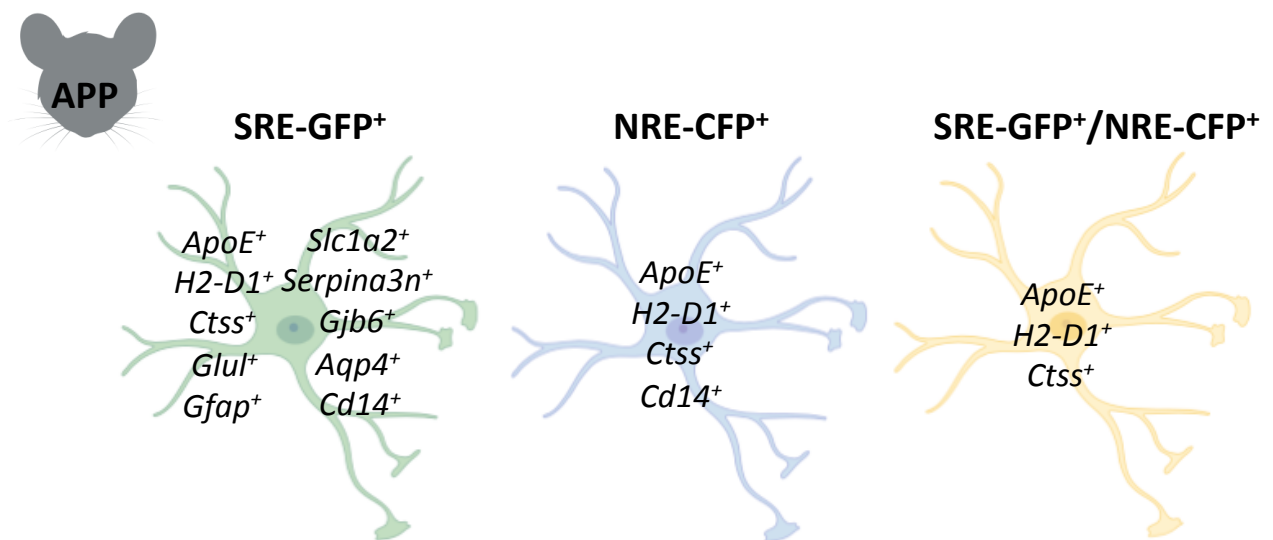


Figure 33. Schéma récapitulatif des gènes marqueurs de chaque population d'astrocytes réactifs identifiés en qPCR chez les souris APP.

5. Hétérogénéité du système de protéostasie dans les classes de signalisation d'astrocytes réactifs du cortex préfrontal

Afin de déterminer si l'hétérogénéité moléculaire des astrocytes réactifs se traduit au niveau fonctionnel, nous avons étudié la fonction de protéostasie des astrocytes. Des études transcriptomiques en microarray menées par l'équipe montrent en effet que la réactivité astrocytaire est associée à une modification de l'activité du protéasome et du lysosome (Abjean et al, en préparation).

Pour étudier ces fonctions, nous avons utilisé des sondes fluorescentes fonctionnelles capables de détecter l'activité du protéasome (Berkers et al., 2007) et des cathepsines (Withana et al., 2016), enzymes lysosomales, sur des cellules uniques. L'activité du protéasome et des cathepsines est proportionnelle à la fluorescence émise, que l'on peut mesurer par FACS sur cellule individuelle (**Figure 28**).

Des souris APP et WT de 9 mois ont été injectées dans le PFC avec les systèmes rapporteurs des voies de signalisation. Pour permettre la combinaison des deux sondes fluorescentes en FACS (**Figure 34**), le rapporteur SRE-GFP a été remplacé par SRE-Tomato. Le rapporteur SRE-Tomato a été co-injecté avec le même rapporteur NRE-CFP que dans les expériences précédentes (**Figure 34**). Un mois et demi après injection, le PFC a été disséqué puis les cellules ont été dissociées avant d'être incubées avec les sondes du protéasome (Berkers et al., 2007) et des cathepsines (Withana et al., 2016). Par FACS, nous avons en particulier étudié l'activité de ces sondes dans les 3 classes d'astrocytes réactifs : simple SRE-Tomato⁺, simple NRE-CFP⁺ et doubles SRE-Tomato⁺/NRE-CFP⁺. Pour cela, nous avons sélectionné l'ensemble des cellules protéasome⁺ et cathepsine⁺, correspondant à tous les types cellulaires, et nous avons analysé les populations d'astrocytes réactifs dans ces populations parents (**Figures 28 et 35A**). La présence d'une population de cellules autofluorescentes qui se superpose aux cellules SRE-Tomato⁺/NRE-CFP⁺ n'a pas permis d'isoler cette population d'astrocytes réactifs doubles marqués. Le nombre de cellules étudiées est indiqué dans la **Figure 35H**.

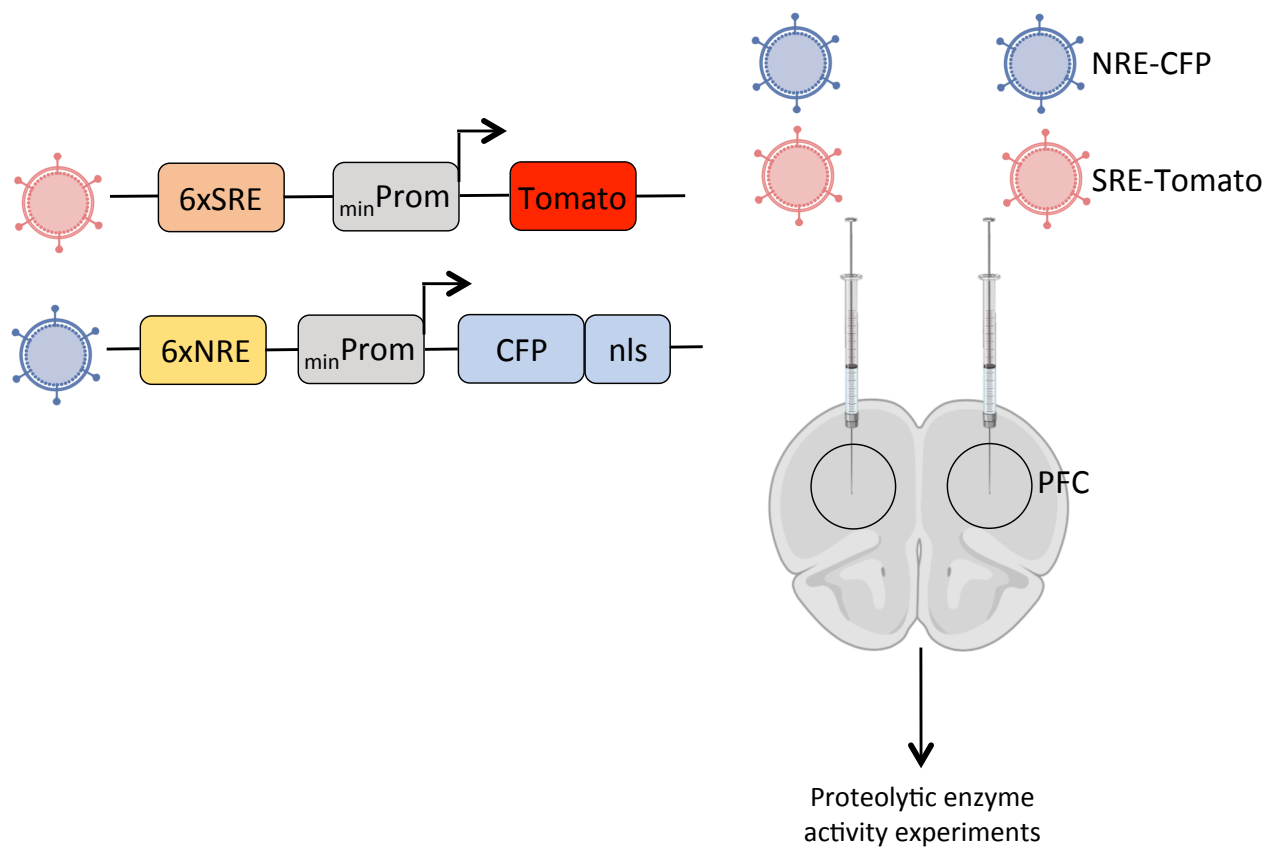


Figure 34. Systèmes rapporteurs des voies de signalisation. Les rapporteurs SRE-Tomato et NRE-CFP ont été injectées dans le PFC de souris mâles WT ou APP afin de réaliser des expériences de mesure de l'activité de protéolyse sur astrocytes triés.

La quantification du pourcentage d'astrocytes parmi l'ensemble des cellules protéasome⁺ montre que les astrocytes SRE-Tomato⁺ sont plus nombreux que les astrocytes NRE-CFP⁺ ($p = 0.03$, **Figures 35B, C**). A l'inverse, les astrocytes NRE-CFP⁺ sont plus nombreux que les astrocytes SRE-Tomato⁺ parmi les cellules cathepsine⁺ ($p = 0.0001$, **Figure 35D, E**). Ces résultats suggèrent que les astrocytes SRE-Tomato⁺ ont une activité protéasome plus importante, alors que les astrocytes NRE-CFP⁺ ont une activité des cathepsines plus importante. Enfin, parmi l'ensemble des cellules doubles protéasome⁺/cathepsine⁺, les astrocytes SRE-Tomato⁺ sont significativement plus nombreux que les astrocytes NRE-CFP⁺ ($p = 0.01$, **Figures 35F, G**).

Pour confirmer ces résultats, une stratégie de sélection inverse a été appliquée et consiste à sélectionner les astrocytes SRE-Tomato⁺ et NRE-CFP⁺ et à étudier l'activité des sondes dans ces deux populations (**Figure 36A**). Cette analyse inverse révèle des résultats identiques avec une activité du protéasome plus importante dans les astrocytes SRE-Tomato⁺ ($p = 0.06$ pour le pourcentage de cellules et $p = 0.03$ pour la fluorescence, **Figures 36B, C**) et une activité cathepsine plus importante dans les astrocytes NRE-CFP⁺ ($p = 0.01$ pour le pourcentage de cellules, **Figure 36D**). En revanche, la fluorescence de la sonde cathepsine est significativement plus élevée dans les astrocytes SRE-Tomato⁺ ($p = 0.03$). Ce découplage montre qu'en proportion les astrocytes SRE-Tomato⁺ avec une activité cathepsine détectable sont moins nombreux mais que le peu d'astrocytes SRE-Tomato⁺ résiduels ont une activité cathepsine plus élevée. Ceci suggère la présence d'une hétérogénéité au sein même des astrocytes SRE-Tomato⁺.

Le pourcentage d'astrocytes de chaque population SRE-Tomato⁺ ou NRE-CFP⁺ ayant une activité positive pour les deux sondes n'est pas différent entre les groupes (**Figure 36F**).

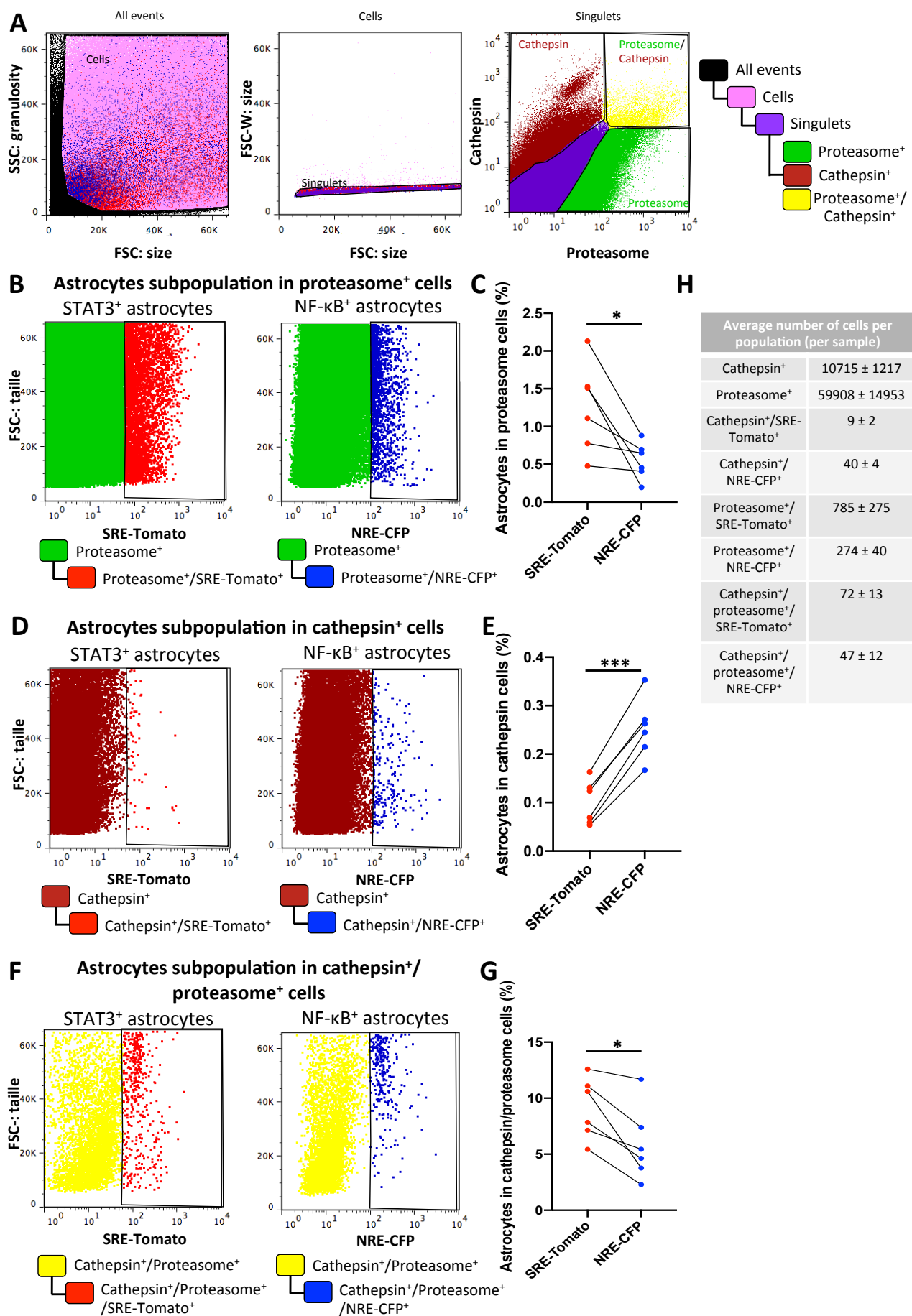


Figure 35. Analyse des activités cathepsine et protéasome dans les astrocytes des souris APP. A. Stratégie de sélection dans laquelle l'ensemble des cellules protéasome⁺ (B, C), cathepsine⁺ (D, E) ou les doubles protéasome⁺/cathepsine⁺ (F, G) ont été sélectionnées. Parmi ces cellules, le pourcentage d'astrocytes SRE-Tomato⁺ ou NRE-CFP⁺ a été mesuré. B. Graphiques illustrant la sélection des astrocytes SRE-Tomato⁺ ou NRE-CFP⁺ parmi l'ensemble des cellules protéasome⁺. Pour une meilleure représentativité, ces graphiques ont été réalisés avec l'ensemble des souris APP même si chaque souris a été analysée indépendamment. C. La quantification du pourcentage d'astrocytes parmi les cellules protéasome⁺ montre que les astrocytes SRE-Tomato⁺ sont plus nombreux que les astrocytes NRE-CFP⁺. D. Graphiques illustrant la sélection des astrocytes SRE-Tomato⁺ ou NRE-CFP⁺ parmi l'ensemble des cellules cathepsine⁺. E. La quantification du pourcentage d'astrocytes parmi les cellules cathepsine⁺ montre que les astrocytes NRE-CFP⁺ sont plus nombreux que les astrocytes SRE-Tomato⁺. F. Graphiques illustrant la sélection des astrocytes parmi les cellules cathepsine⁺/protéasome⁺. G. La quantification montre qu'il y a davantage d'astrocytes SRE-Tomato⁺ parmi les cellules cathepsine⁺/protéasome⁺. Test t apparié. Les lignes connectent les valeurs mesurées dans les populations SRE-Tomato⁺ et NRE-CFP⁺ au sein de la même souris (C, E, G). H. Nombre moyen de cellules par souris dans chacune des populations étudiées $\pm$ SEM. N=6 souris analysées au total.

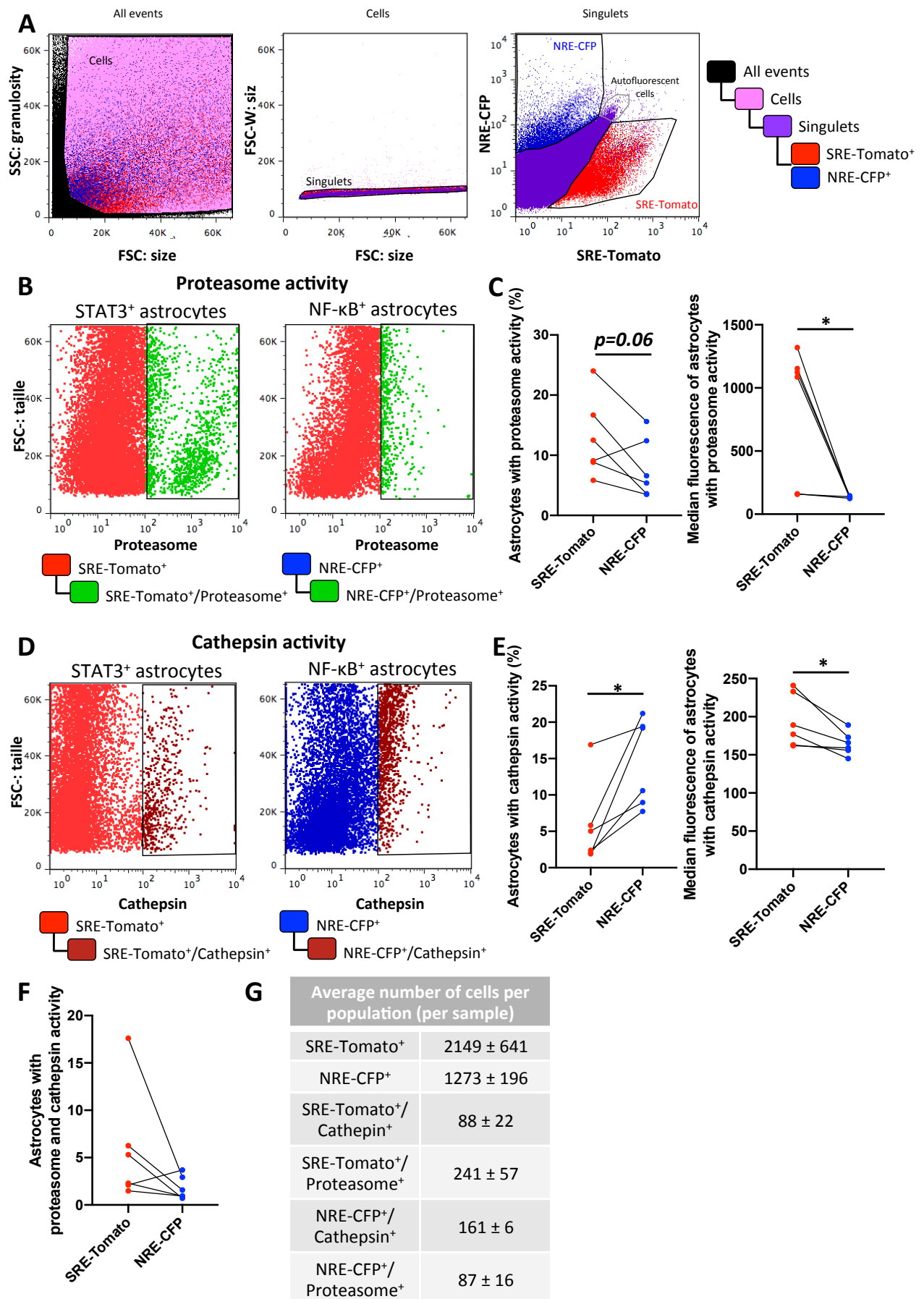


Figure 36. Autre stratégie d'analyse des activités cathepsine et protéasome dans les astrocytes des souris APP. **A.** Stratégie de sélection inverse dans laquelle les astrocytes SRE-Tomato⁺ et NRE-CFP⁺ ont été sélectionnés en premier. Les cellules autofluorescentes, superposant avec les astrocytes SRE-Tomato⁺/NRE-CFP⁺, sont représentées par un cadran gris. L'activité des sondes dans les deux populations a ensuite été étudiée. **B.** Graphiques illustrant la sélection des astrocytes protéasome⁺ parmi les deux populations SRE-Tomato⁺ et NRE-CFP⁺. Pour une meilleure représentativité, ces graphiques ont été réalisés avec l'ensemble des souris APP même si chaque souris a été étudiée indépendamment pour l'analyse. **C.** La quantification du pourcentage d'astrocytes protéasome⁺ montre que les astrocytes SRE-Tomato⁺ ont tendance à avoir une activité protéasome plus importante et la médiane de fluorescence de ces cellules est significativement plus élevée dans les astrocytes NRE-CFP⁺ (panneau droit). **D.** Graphiques illustrant la sélection des astrocytes cathepsine⁺ parmi les deux populations d'astrocytes réactifs. **E.** La proportion d'astrocytes ayant une activité cathepsine⁺ est plus importante parmi les astrocytes NRE-CFP⁺ que les astrocytes SRE-Tomato⁺ (panneau gauche). En revanche, la médiane de fluorescence des cellules est plus élevée dans les astrocytes SRE-Tomato⁺ (panneau droit). **F.** Quantification du pourcentage d'astrocytes double protéasome⁺/cathepsine⁺. Pourcentages: test t apparié; Fluorescence: test apparié de Wilcoxon. Les lignes connectent les valeurs mesurées dans les populations SRE-Tomato⁺ et NRE-CFP⁺ au sein de la même souris (C, E, F). **G.** Nombre moyen de cellules par souris dans chacune des populations étudiées $\pm$ SEM. N=6 souris analysées au total.

Enfin, une étude de clusterisation par la méthode t-SNE a été menée en combinant les 6 souris APP, précédemment analysées de manière indépendante (**Figure 37**). Cette méthode est un algorithme de réduction de dimension basé sur une interprétation probabiliste des proximités. Cette technique nous permet donc de visualiser nos données en 2 dimensions alors que notre expérience comporte 6 paramètres initiaux (astrocytes SRE-Tomato⁺; NRE-CFP⁺; cellules protéasome⁺; cellules cathepsine⁺; FSC: indicateur de taille des cellules et SSC: indicateur de la granulosité). Dans ce type de visualisation, plus les cellules sont proches dans l'espace de réduction, plus elles sont similaires. En d'autres termes, les cellules proches auront un ou plusieurs paramètres communs, soit en terme d'expression des sondes, soit en terme d'expression des protéines fluorescentes associées à nos systèmes rapporteurs. Cette étude a été réalisée sur l'ensemble des cellules protéasome⁺ (430 000 cellules), cathepsine⁺ (145 904 cellules) et double protéasome⁺/cathepsine⁺ (6 971 cellules).

Parmi les cellules protéasome⁺, on distingue 2 clusters majoritaires d'astrocytes SRE-Tomato⁺ (**Figure 37A**, ronds rouges) et un majoritaire d'astrocytes NRE-CFP⁺ (**Figure 37A**, rond bleu). Un cluster entremêlé (**Figure 37A**, rond violet) comprend des astrocytes des deux classes. Néanmoins, les clusters majoritaires de chaque classe sont bien distincts ce qui confirme l'existence de populations d'astrocytes réactifs différentes. Les astrocytes SRE-Tomato⁺ sont nettement plus nombreux, comme précédemment observé. Parmi les cellules cathepsine⁺, on distingue également des clusters bien séparés entre les deux populations d'astrocytes réactifs. Les astrocytes SRE-Tomato⁺ (**Figure 37B**, rond rouge) forment un seul cluster majoritaire alors que les astrocytes NRE-CFP⁺ (**Figure 37B**, ronds bleus) semblent être répartis en 3 sous clusters. L'intensité de fluorescence de la sonde cathepsine est plus forte dans les astrocytes NRE-CFP⁺, en concordance avec les résultats obtenus par analyse des souris individuelles (**Figure 37B**). Enfin, parmi les cellules double protéasome⁺/cathepsine⁺, on distingue un cluster majoritaire et bien distinct pour les astrocytes SRE-Tomato⁺, même si d'autres clusters moins importants sont aussi visibles (**Figure 37C**, ronds rouges). Les astrocytes NRE-CFP⁺ forment un cluster unique (**Figure 37C**, rond bleu).

La présence de plusieurs sous clusters d'astrocytes SRE-Tomato⁺ ou NRE-CFP⁺ suggère qu'il existe encore une hétérogénéité au sein de chaque population identifiée par une cascade.

Ainsi, les classes moléculaires d'astrocytes réactifs sont associées à une hétérogénéité de la fonction de protéostasie avec une utilisation préférentielle du protéasome par les astrocytes SRE-Tomato⁺ et une activation préférentielle des lysosomes pour les astrocytes NRE-CFP⁺. Néanmoins, il est important de noter que c'est l'équilibre de l'utilisation d'un système de protéostasie ou d'un autre qui est modifié entre les classes d'astrocytes réactifs. Il ne s'agit donc pas d'un effet de tout ou rien ou une classe utilise exclusivement un des deux systèmes de protéostasie.

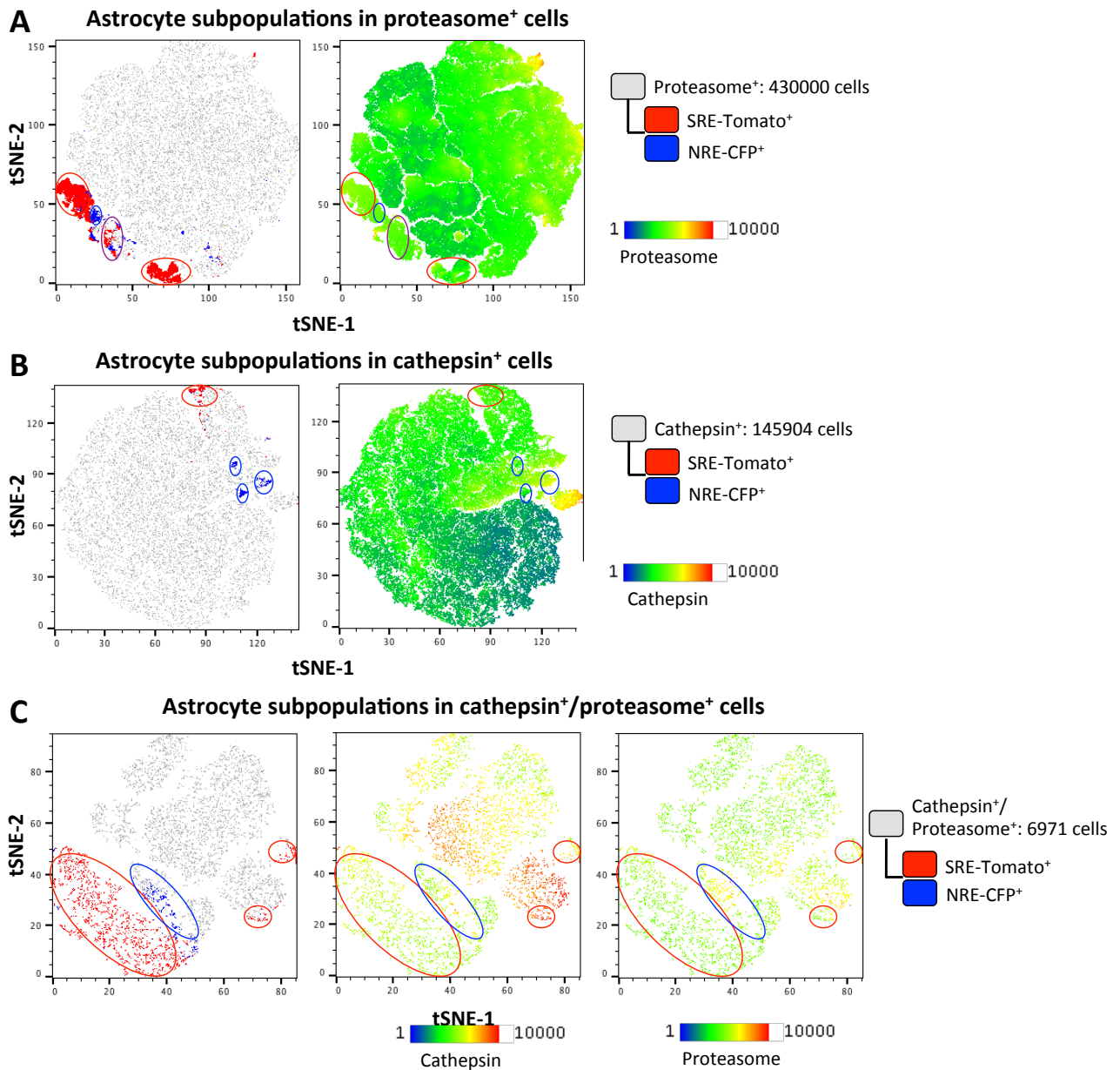


Figure 37. Analyse t-SNE de l'activité de protéolyse et des voies de signalisation activées dans les astrocytes APP. A. En combinant les cellules provenant des 6 souris APP utilisées pour cette étude, un total de 430 000 cellules protéasome⁺ a été identifié. Ces données ont été extraites et une étude de clusterisation a été réalisée sur *Flowjo*. Les données présentées en graphique t-SNE montrent l'existence de clusters à la fois communs et distincts entre les 2 populations d'astrocytes réactifs SRE-Tomato⁺ et NRE-CFP⁺. Un codage en fausses couleurs de l'intensité de fluorescence de la sonde protéasome montre une activité légèrement plus intense dans les astrocytes SRE-Tomato⁺. B. Un total de 145 904 cellules cathepsine⁺ a été identifié. Les t-SNE montrent des clusters distincts entre les 2 populations d'astrocytes réactifs et l'activité de la sonde cathepsine est plus élevée dans les astrocytes NRE-CFP⁺. C. Un total de 6971 cellules double cathepsine⁺/protéasome⁺ a été identifié et les t-SNE montrent des clusters différents entre les populations d'astrocytes réactifs.

La quantification du pourcentage d'astrocytes des 2 populations parmi l'ensemble des cellules protéasome⁺ et cathepsine⁺ a également été réalisée chez les souris WT. Le nombre de cellules étudiées est indiqué en **Figure supplémentaire 2B**. Cette étude révèle des résultats similaires aux souris APP avec un pourcentage d'astrocytes SRE-Tomato⁺ plus important parmi les cellules protéasome⁺ et une tendance à l'augmentation du pourcentage d'astrocytes NRE-CFP⁺ parmi les cellules cathepsine⁺ ($p=0.07$, **Figure supplémentaire 2A**). De même que chez les souris APP, la quantification du pourcentage d'astrocytes parmi les cellules exprimant à la fois le protéasome et les cathepsines montre que les astrocytes SRE-Tomato⁺ sont significativement plus nombreux (**Figure supplémentaire 2A**). Ainsi, l'hétérogénéité fonctionnelle est aussi présente dans les souris WT et aucune différence significative entre les souris APP et les souris WT n'a été montrée.

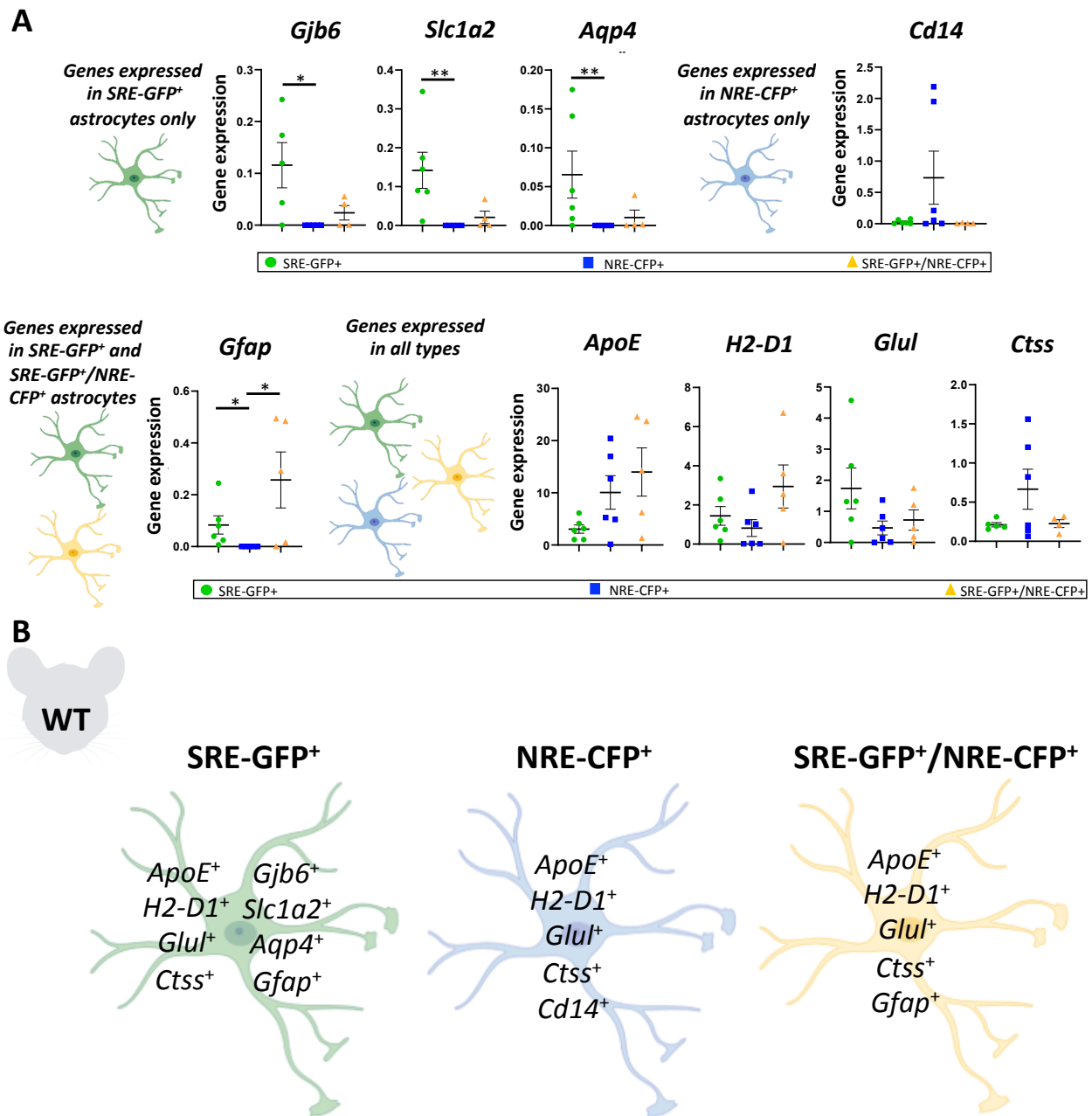


Figure supplémentaire 1. Dans les souris WT, l'activation des cascades est également associée à des profils moléculaires différents. A. L'expression des gènes étudiés dans les souris APP a également été étudiée dans les souris WT. Certains gènes comme *ApoE*, *H2-D1* et *Ctss* ont des profil d'expression identique aux souris APP. Au contraire, d'autres gènes comme *Glul* et *Cd14* ne sont pas exprimés par les mêmes classes d'astrocytes que chez les souris APP. Néanmoins, cette expérience confirme l'existence de profils moléculaires différents entre les classes d'astrocytes chez les souris WT. Pour la majorité des gènes: test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple de Dunn. Sinon, ANOVA suivi du post-hoc de Tukey. B. Schéma récapitulatif des gènes marqueurs de chaque population d'astrocytes réactifs identifiés en qPCR chez les souris WT.

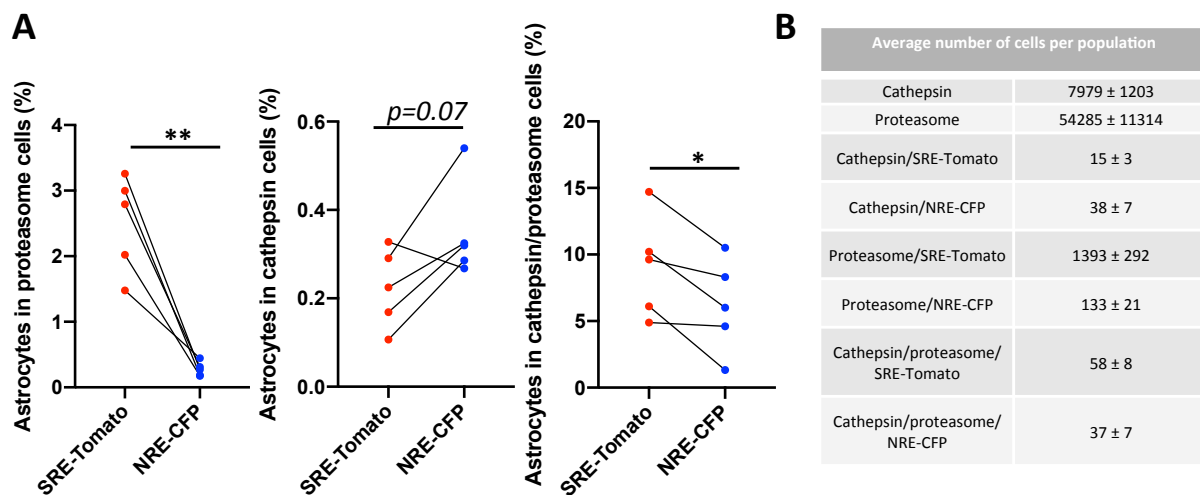


Figure supplémentaire 2. Analyse des activités cathepsine et protéasome dans les astrocytes des souris WT. **A.** En utilisant la stratégie de sélection de l'ensemble des cellules protéasome⁺ (panneau gauche), cathepsine⁺ (panneau milieu) ou double (panneau droit), les quantifications montrent que les astrocytes SRE-Tomato⁺ sont plus nombreux parmi les cellules protéasome⁺ alors que les astrocytes NRE-CFP⁺ ont tendance à être plus nombreux parmi les cellules cathepsine⁺. Enfin, il y a davantage d'astrocytes SRE-Tomato⁺ parmi les cellules cathepsine⁺/protéasome⁺. Test t apparié. **B.** Nombre moyen de cellules par souris dans chacune des populations étudiées ± SEM.

Discussion

I. La voie JAK2-STAT3 est nécessaire et suffisante pour l'induction des caractéristiques principales de la réactivité

1. La voie JAK2-STAT3 est centrale dans la réactivité astrocytaire au cours des MND

Les astrocytes sont des cellules gliales complexes capables de réagir face à un stimulus pathologique en devenant réactifs, comme au cours de la MA. De nombreuses voies de signalisation sont impliquées dans la réactivité astrocytaire comme la voie JAK2-STAT3, NF- κ B et CN/NFAT (Ben Haim et al., 2015a; Kang & Hébert, 2011).

Notre équipe a établi une stratégie de modulation de la voie JAK2-STAT3, *in vivo*, spécifiquement dans les astrocytes, à l'aide de vecteurs viraux adéno-associés. En particulier, l'équipe a développé des vecteurs viraux permettant d'exprimer dans les astrocytes l'inhibiteur endogène majoritaire de la voie, SOCS3 (Babon et al., 2012) ou une forme constitutivement active de JAK2 (JAK2ca) (Haan et al., 2009). L'expression de SOCS3 dans l'hippocampe de deux modèles murins de la MA, les souris APP/PS1dE9 (APP) et les souris 3xTg-AD (3xTg), diminue des marqueurs clés de la réactivité comme l'hypertrophie, au niveau morphologique et la surexpression des protéines des filaments intermédiaires (GFAP, Vimentine), au niveau protéique. Ces résultats ont été confirmés par une approche transcriptomique sur des astrocytes triés de souris APP injectées avec un virus codant pour SOCS3 (Article 1). Cette expérience montre que l'expression de gènes liés à la réactivité et induits dans les astrocytes APP comme *Gfap*, *Vimentine* et *Serpina3n* est bien diminuée dans les astrocytes SOCS3. Au-delà de ces marqueurs, SOCS3 restaure le transcriptome des astrocytes de souris APP. Au contraire, la suractivation de la voie par l'expression de JAK2ca dans l'hippocampe de ces modèles murins de la MA, augmente la réactivité astrocytaire par rapport à des souris APP injectées avec un vecteur contrôle. Ceci se traduit par une hypertrophie et une surexpression de la GFAP et la Vimentine dans les astrocytes réactifs. Notre étude révèle donc un rôle central de la voie JAK2-STAT3 dans l'induction des caractéristiques de la réactivité.

La voie JAK2-STAT3 est aussi activée dans les astrocytes de modèles ou patients atteints de SEP (Lu et al., 2013), de SLA (Ohgomori et al., 2017), de MND comme la maladie de Parkinson (Choi et al., 2018) ou la maladie de Huntington (Ben Haim et al., 2015b), ou encore dans des cas de métastases du cerveau (Priego et al., 2018) ou de glioblastomes (Henrik Heiland et al., 2019). La voie est aussi activée dans différents modèles de lésions aiguës comme le trauma de la moelle (Chen et al., 2018), du cortex (Oliva et al., 2012), l'ischémie (Cheng et al., 2019) ou l'épilepsie (Han et al., 2018).

En particulier, l'équipe a montré l'importance de cette voie dans un modèle transgénique et un modèle lentiviral murin et primate de la maladie de Huntington (Ben Haim et al., 2015b; Abjean et al, en préparation). L'expression de SOCS3 dans le striatum de modèles murins de cette maladie réduit les caractéristiques morphologiques et moléculaires de la réactivité (Ben Haim, et al., 2015b; Abjean et al, en préparation).

L'ensemble de ces études montre donc l'importance de la voie JAK2-STAT3 dans la réactivité astrocytaire et son universalité dans différentes maladies, différents modèles et différentes régions cérébrales.

De manière intéressante, l'importance de cette voie de signalisation est appuyée par notre étude modulant la réactivité astrocytaire en dehors de tout contexte

pathologique. L'injection de JAK2ca dans l'hippocampe de souris WT suffit en effet à induire les caractéristiques principales de la réactivité (hypertrophie, surexpression de la GFAP et la Vimentine aux niveaux ARNm et protéiques). De même, dans les astrocytes du striatum, JAK2ca induit des changements de l'expression de centaines de gènes dont beaucoup sont liés à la réactivité ou la réponse immunitaire (Abjean et al., en préparation). Au niveau fonctionnel, JAK2ca entraîne des dysfonctions de la transmission et de la plasticité synaptique chez les souris WT, à l'image des déficits retrouvés chez les souris modèles de la MA. Cette étude démontre donc que la voie JAK2-STAT3 est suffisante pour induire la réactivité et les dysfonctions associées.

Plus généralement, les AAV ciblant la voie JAK2-STAT3 dans les astrocytes apparaissent comme des outils versatiles pour moduler la réactivité astrocytaire dans différents modèles et conditions.

2. Différentes approches pour moduler la voie JAK2-STAT3

Dans notre étude, nous avons modulé la réactivité astrocytaire par une stratégie virale ciblant la voie JAK2-STAT3. D'autres approches ont été utilisées dans la littérature pour moduler cette voie de signalisation dans les astrocytes. Par exemple, Reichenbach et al., ont utilisé une approche de délétion conditionnelle de STAT3 (cKO) spécifiquement dans les astrocytes dans le même modèle de souris APP (Reichenbach et al., 2019). Pour cela, ils ont utilisé une lignée de souris exprimant la Cre recombinase inducible par le tamoxifène sous contrôle d'un promoteur astrocyte-spécifique Cx43 (Eckardt et al., 2004). A l'image de notre étude, les auteurs montrent une diminution de l'expression de gènes liés à la réactivité en l'absence de STAT3. Les auteurs utilisent une autre stratégie de blocage de la voie par utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de STAT3 injecté par voie systémique pendant 6 semaines. Les effets de cet inhibiteur systémique sur les caractéristiques de la réactivité ne sont pas étudiés, seule une diminution du nombre d'astrocytes phospho-STAT3⁺ est observée (Reichenbach et al., 2019). Dans une autre étude de lésion de la moelle, la cKO de STAT3 dans les astrocytes induit aussi une diminution de gènes liés à la réactivité (Anderson et al., 2016). Cependant, il est intéressant de noter que la modulation de la réactivité astrocytaire par cette stratégie n'est que partielle puisque STAT3 n'est pas délété dans tous les astrocytes. (Reichenbach et al., 2019). De même, l'utilisation d'inhibiteurs systémiques de STAT3 ne permet pas, à elle seule, de démontrer un rôle spécifique de la voie JAK2-STAT3 astrocytaire, car ces inhibiteurs vont agir dans différents types cellulaires, y compris en dehors du SNC et sur de nombreux processus cellulaires (Gu et al., 2020). A l'inverse, notre stratégie virale permet une expression spécifique des transgènes dans les astrocytes par utilisation d'un promoteur synthétique de la GFAP et d'un sérotype 9, ciblant préférentiellement les astrocytes. Tout comme l'étude de Reichenbach et al., notre stratégie permet un contrôle temporel de l'activation/désactivation de la voie. Néanmoins, notre stratégie présente davantage de sélectivité car nous ciblons préférentiellement la voie canonique de JAK2-STAT3 alors que le cKO de STAT3 dans les astrocytes affecte probablement les fonctions non canoniques de STAT3. En effet, la voie JAK2-STAT3 est complexe et l'activation de STAT3 peut se faire indépendamment de JAK2. Il a par exemple été montré que d'autres kinases appartenant à la voie des MAPK ou d'autres signalisations médiées par les RCPG sont capables d'activer STAT3 (Ceyzeriat et al., 2016). Un autre niveau de complexité s'ajoute puisque STAT3 peut aussi avoir des fonctions

indépendantes de son rôle de facteur de transcription. Par exemple, STAT3 est impliqué dans la modulation de la chromatine, l'interaction avec les microtubules ou l'autophagie (Ceyzériat et al., 2016). Ainsi, il se pourrait que le cKO de STAT3 affecte ces autres fonctions.

3. La voie JAK2-STAT3 agit comme un master régulateur de la réactivité dans la MA

Notre approche transcriptomique sur des astrocytes triés de souris APP injectées avec SOCS3 montre que des gènes décrits comme marqueurs de classes d'astrocytes réactifs de type A1 (*H2-D1*, *H2-T23*, *C3*) et A2 (*Cd14*, *Tm4sf1*) par Liddel et al., 2017, sont tous induits dans les astrocytes APP et diminués par SOCS3 (Article 1). Nous avons d'ailleurs validé la diminution de l'expression de CD14 et Tm4sf1 au niveau protéique sur des coupes de cerveau en immunohistochimie (données non montrées). Ces résultats suggèrent que l'action de la voie JAK2-STAT3 se fait en amont de la spécification d'éventuelles classes de type A1 ou A2, qui restent à démontrer, en particulier, *in vivo*. Il serait intéressant d'étudier l'expression de ces marqueurs chez les souris 3xTg afin de savoir si la modification du contexte pathologique a un effet sur leur expression ou la modification de leur expression par SOCS3.

La voie JAK2-STAT3 semble agir comme un master régulateur de la réactivité mais son rôle sur d'éventuelles classes d'astrocytes réactifs ne peut pas être évalué par notre approche transcriptomique astrocyte-spécifique mais 'bulk' où de potentielles sous populations d'astrocytes réactifs sont mélangées.

4. Interactions de la voie JAK2-STAT3 avec d'autres signalisations

La signalisation est un phénomène complexe impliquant de multiples interactions entre voies de signalisation qui peuvent interagir entre elles. La voie JAK2-STAT3 est connue pour coopérer et interagir avec de nombreuses autres voies de signalisation. Nous avons vérifié l'absence de l'activation de la voie des MAPK dans nos expériences mais en raison de la difficulté de la mise au point de marquages en histologie, nous n'avons pas démontré une absence d'activation de la voie NF- κ B. Cette voie est en effet impliquée dans la modulation de la réactivité astrocytaire et semble induire des gènes potentiellement synaptotoxiques (Lian et al., 2016b). L'interaction entre la voie JAK2-STAT3 et NF- κ B spécifiquement dans les astrocytes réactifs est peu documentée. Seule une étude montre la coopération entre les deux voies dans des cultures d'astrocytes réactifs de rat induits par le LPS pour entraîner l'expression de la protéine GAP43 (Growth-associated protein 43) (Hung et al., 2016). Cette interaction est davantage documentée dans le domaine de la cancérologie et en particulier dans les glioblastomes. Il a en effet été montré que STAT3 et NF- κ B interagissent de manière physique dans le noyau de cellules de glioblastomes (da Hora et al., 2019; Kesanakurti et al., 2013) et agissent en coopération dans la réponse inflammatoire liée aux cancers du colon, du foie et de l'estomac (Fan et al., 2013). De plus, la voie NF- κ B induit l'expression de cytokines capables d'activer à leur tour la signalisation STAT3 (Grivennikov & Karin, 2010). Ces voies sont capables d'agir en synergie sur un même gène cible pour induire sa transactivation ou sa répression en fonction du contexte pathologique (Oeckinghaus et al.,

2011). L'activation de ces voies peut se faire en cascade puisque des gènes cibles de la voie JAK2-STAT3 sont des activateurs de la voie NF- κ B (Oeckinghaus et al., 2011). Au contraire, ces deux voies peuvent s'inhiber de manière réciproque via leurs inhibiteurs respectifs (Grivennikov & Karin, 2010). Par exemple, SOCS3 induit par l'activation de la voie JAK2-STAT3 régule négativement l'expression des TLR, impliqués dans l'activation de la voie NF- κ B (Yoshimura et al., 2003).

Ainsi, la réactivité déclenchée par la voie JAK2-STAT3 pourrait être modulée et affinée par d'autres signalisations, dont la voie NF- κ B, résultant en l'expression de différentes classes d'astrocytes réactifs.

II. Rôle globalement délétère mais complexe des astrocytes réactifs dans la MA

1. La réactivité astrocytaire est associée à d'importants changements transcriptionnels

Au cours de la MA, de nombreuses dysfonctions des astrocytes réactifs sont observées et semblent être impliquées dans la physiopathologie de la maladie. Globalement, une perte des fonctions de support et des fonctions neuroprotectrices des astrocytes est observée associée à un gain de fonctions délétères (Arranz & De Strooper, 2019; Chun & Lee, 2018; Perez-Nievas & Serrano-Pozo, 2018). Ces changements fonctionnels s'expliquent par de profondes modifications du transcriptome des astrocytes réactifs au cours de la MA. En effet, notre étude transcriptomique sur les astrocytes de souris APP démontre une surexpression de gènes liés à l'inflammation et l'immunité comme certaines cytokines (*Il-1 β*), chimiokines (*ccl2*, *ccl4*, *ccl6*) et molécules du complément (*C1qa*, *C1qb*, *C1qc*, *C4b*) (Article 1). Notre étude corrèle avec l'étude transcriptomique astrocytes-spécifique 'bulk' d'Orre et al sur des souris APP. Parmi les gènes surexprimés dans la MA, on retrouve des cytokines (*Il-1 β*), chimiokines (*ccl3*, *cl4*, *cl5*) et molécules du complément (*C1s*, *C1q*) (Orre, et al., 2014a), à l'image de notre étude. Nos résultats sont aussi en accord avec des études plus récentes de séquençage sur noyaux d'astrocytes uniques dans le modèle murin 5xFAD (Habib et al., 2020) ou chez l'Homme (Mathys et al., 2019). Dans l'étude d'Habib et al, les auteurs comparent le transcriptome de noyaux d'astrocytes WT à ceux de souris 5xFAD et identifient une sous-population d'astrocytes spécifique de la maladie dans l'hippocampe (DAA : « disease-associated astrocytes ») (Habib et al., 2020). Parmi les gènes surexprimés dans les DAAs, on retrouve des gènes de réactivité globale comme *Gfap*, *Vimentine* et *Serpina3n* mais cette sous-population est caractérisée par une signature transcriptomique unique comprenant des gènes impliqués dans les réponses inflammatoires ou la cascade du complément comme *C4b*. Dans l'ensemble, ces études convergent vers un changement de la voie du complément dans les astrocytes réactifs au cours de la MA. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer le rôle de cette sous-population dans les déficits de la MA. Dans l'étude de Mathys et al, les auteurs étudient le transcriptome de 6 types cellulaires majeurs dans le cortex préfrontal humain, y compris les astrocytes, et montrent que chacun de ces types forme des sous-populations distinctes au niveau transcriptionnel (Mathys et al., 2019). En particulier, ils identifient 4 sous-populations d'astrocytes (Ast0 à Ast4) dont la population Ast1 est uniquement observée chez des

patients MA et caractérisée par des gènes liés à l'immunité/inflammation (exemples : *IL17RB*, *C10orf54*,...) et la reconnaissance d'antigènes (*CD81*,...). Enfin, Il est intéressant de noter que certains de ces gènes comme les cytokines sont associés à des déficits caractéristiques de la MA voire même le passage d'un état MCI à un état de démence chez l'Homme. Il a en effet été montré que cette conversion était favorisée par des concentrations élevées de cytokines pro-inflammatoires (Heneka et al., 2015).

Ensemble ces études montrent de profonds changements transcriptionnels dans les astrocytes réactifs qui présentent une hétérogénéité moléculaire que l'on commence à peine à explorer dans la MA.

2. L'inhibition des astrocytes réactifs améliore certains déficits fonctionnels dans les modèles APP/PS1dE9 et 3xTg-AD

L'inhibition des astrocytes réactifs par notre stratégie virale utilisant SOCS3 est en accord avec un rôle délétère de la réactivité dans la MA. En effet, nous avons montré que le blocage de la voie JAK2-STAT3 par SOCS3 améliore la pathologie amyloïde en diminuant le nombre de plaques d'environ 30% chez les souris APP. Le blocage de la réactivité améliore aussi l'apprentissage spatial de façon modérée chez ces souris. De manière intéressante, la surexpression de la voie par JAK2ca est associée à des effets en miroir avec une augmentation de la charge amyloïde d'environ 25%. Bien que modérés, ces effets montrent une contribution de la réactivité astrocytaire aux déficits d'apprentissage et le ciblage de la réactivité astrocytaire ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Chez les souris 3xTg, l'inhibition de la réactivité entraîne une restauration de la transmission et de la plasticité synaptique ainsi qu'une diminution modérée de l'anxiété. En revanche, aucun effet de SOCS3 n'a été observé sur la mémoire de travail évaluée par le test du labyrinthe en Y (**Article 2**). Ces effets différentiels entre l'amélioration de la transmission/plasticité synaptique en électrophysiologie et l'absence d'effet sur la mémoire peuvent s'expliquer par différentes régions ciblées par notre approche virale. En effet, l'AAV-SOCS3 est injecté dans la région CA1 de l'hippocampe correspondant justement à la région dans laquelle les potentiels post-synaptiques de champ ont été mesurés en électrophysiologie. Au contraire, la mémoire de travail est un processus complexe qui implique d'autres régions cérébrales que l'hippocampe, comme le cortex préfrontal, qui n'est pas ciblé par nos vecteurs viraux (Funahashi, 2017). Cette hypothèse peut aussi expliquer l'effet bénéfique de SOCS3 sur l'apprentissage spatial dans le test de la piscine de Morris chez les souris APP et l'absence d'effet sur la mémoire de travail chez les souris 3xTg-SOCS3. En effet, ces tests comportementaux, bien qu'évaluant tous deux les capacités mnésiques, n'impliquent pas forcément les mêmes circuitries neuronales (Hölter et al., 2015). Il a par exemple été montré que le test du labyrinthe en Y requiert une interaction entre différentes régions du cerveau comme l'hippocampe et le cortex préfrontal (Kraeuter et al., 2019) alors que le test de la piscine de Morris requiert majoritairement l'hippocampe (Vorhees & Williams, 2006) et en particulier, l'hippocampe dorsal que nous ciblons (Moser et al., 1993). Afin de rigoureusement comparer ces deux modèles murins de la MA, il serait intéressant de réaliser le test de la piscine de Morris avec les souris 3xTg.

Les effets de SOCS3 sur la diminution de la pathologie amyloïde et l'amélioration de l'apprentissage spatial chez les souris APP sont en accord avec l'étude de Reichenbach et al, inhibant la réactivité astrocytaire par cKO de STAT3 (Reichenbach et al., 2019). Dans cette étude, les auteurs montrent en effet une amélioration de ces deux index de la MA. De plus, les auteurs étudient les effets du cKO de STAT3 sur l'activité calcique dans les neurones et les astrocytes du cortex à l'aide d'un indicateur calcique. Ils montrent que l'hyperréactivité des astrocytes, caractéristique de la MA (Delekate et al., 2014; Ortinski et al., 2010b; Reichenbach et al., 2018), est diminuée par la délétion de STAT3, montrant ainsi le rôle délétère des astrocytes réactifs sur les dérégulations de l'activité du réseau dans la MA. De façon intéressante, l'amélioration des déficits mnésiques et la diminution de l'hyperexcitabilité du réseau sont aussi observées par injection d'un inhibiteur systémique de STAT3 chez les souris APP. Ainsi, le potentiel thérapeutique de ces inhibiteurs mérite d'être davantage exploré.

Mais contrairement à notre étude, Reichenbach et al, démontrent que l'inhibition de la réactivité entraîne une augmentation de la phagocytose de l'A β par la microglie. Précédemment, nous avons émis l'hypothèse que le cKO de STAT3 pourrait affecter des fonctions non canoniques de STAT3, c'est à dire non médiées par son activation par JAK2. L'effet du cKO de STAT3 sur l'augmentation de la phagocytose par la microglie pourrait donc s'expliquer non pas par un effet direct du blocage de la voie JAK-STAT3, que nous ciblons, mais par des effets liés au blocage des autres fonctions de STAT3. Cette hypothèse expliquerait aussi que notre étude ne démontre pas d'activation de la microglie ou d'altérations de sa morphologie, basée sur l'étude du marqueur Iba1 (données non montrées) contrairement à l'étude de Reichenbach et al, montrant de profondes modifications de la morphologie des microglies qui émettent davantage de prolongements au niveau des plaques amyloïdes. Ces modifications morphologiques sont d'ailleurs plus importantes que celles subies par les astrocytes (Reichenbach et al., 2019).

D'autres stratégies ont été utilisées pour moduler la réactivité astrocytaire *in vivo*, dont certaines révèlent un rôle des astrocytes réactifs dans les déficits fonctionnels de la MA. Certaines études ont utilisé un KO de protéines des filaments intermédiaires GFAP et Vimentine chez les souris APP. Cette stratégie entraîne des effets non concordants avec une absence d'effet sur différents index de la pathologie (Kamphuis et al., 2015) ou au contraire un rôle bénéfique des astrocytes réactifs démontré par une augmentation de la charge amyloïde et une diminution du nombre de neurites dystrophiques chez les souris KO (Kraft et al., 2013). Cependant, cette stratégie semble peu adaptée à l'étude des astrocytes réactifs notamment car elle impacte de manière significative le transcriptome des astrocytes et leurs fonctions physiologiques (Kamphuis et al., 2015). Une autre étude utilisant une stratégie de blocage de la voie CN/NFAT via un peptide appelé VIVIT chez les souris APP, a montré une diminution de la charge amyloïde ainsi qu'une amélioration des déficits cognitifs, des altérations synaptiques et une diminution de l'hyperexcitabilité neuronale (Furman et al., 2012; Sompol et al., 2017). A l'image de notre étude, ces travaux montrent un rôle délétère des astrocytes réactifs mais cette stratégie manque de spécificité et de sélectivité. Notamment, il a été montré que ce peptide peut être sécrété par les astrocytes et pourrait donc agir directement sur les neurones pour améliorer les déficits fonctionnels (Furman et al., 2012).

Enfin, il est important de noter que d'autres stratégies, non sélectives de la réactivité astrocytaire, mais ciblant plus spécifiquement un gène ou une voie de signalisation spécifique dans les astrocytes permettent de mieux comprendre les dysfonctions des

astrocytes réactifs dans la MA (voir paragraphe III.3 de l'introduction). Par exemple, l'étude de Lian et al, montre que l'activation de la voie NF- κ B dans les astrocytes réactifs au cours de la MA entraîne l'activation de la molécule du complément C3, qui par fixation à son récepteur C3aR sur les neurones, entraîne des dysfonctions neuronales associées à déficits cognitifs. Le blocage de ce récepteur restaure ces déficits (Lian et al., 2015). Les études de Jo et al et Wu et al, montrent une production/libération anormalement élevée de GABA par les astrocytes réactifs dans les souris APP et 5xFAD. Les auteurs montrent que l'inhibition de la MAO-B (Jo et al., 2014; Park et al., 2019) ou du transporteur astrocyte-spécifique du GABA, GAT3/4 (Wu et al., 2014) réduit la signalisation aberrante du GABA et améliore les déficits mnésiques. Plus récemment, dans notre laboratoire, il a été montré que la biosynthèse de la L-sérine par les astrocytes est altérée dans les astrocytes de souris 3xTg ou chez les patients MA. L'apport alimentaire de L-sérine améliore les déficits synaptiques et comportementaux chez les souris 3xTg (Le Douce et al., 2020).

Dans l'ensemble, ces études illustrent un rôle global délétère des astrocytes réactifs dans la MA mais démontrent l'importance d'utiliser une stratégie de modulation spécifique et sélective des astrocytes réactifs pour évaluer leur contribution dans la maladie. Certains points de divergence entre toutes ces études ne s'expliquent pas forcément par des raisons méthodologiques mais la réactivité astrocytaire pourrait être modulée par l'environnement cérébral et être ainsi sensible au contexte pathologique.

3. Sensibilité de la réactivité astrocytaire au contexte pathologique

Bien que des effets bénéfiques de l'inhibition des astrocytes réactifs par SOCS3 sur les altérations de la transmission et la plasticité synaptique ainsi que l'anxiété ont été démontrés chez les souris 3xTg (**Articles 1 et 2**), d'autres index de la pathologie ne semblent pas être affectés dans ce modèle. En effet, nous n'avons pas observé d'effets de SOCS3 sur la pathologie amyloïde et la pathologie Tau. Les effets non concordants entre l'effet bénéfique de SOCS3 sur la pathologie amyloïde chez les souris APP et son absence d'effet chez les souris 3xTg ne sont a priori pas d'origine technique. En effet, nous avons utilisé des techniques identiques pour les deux études pour détecter les plaques amyloïdes (marquage MxO4), évaluer leur nombre et leur surface (données non montrées pour les APP). De même, la concentration des peptides A β a été évaluée à l'aide des mêmes tests ELISA en suivant le même protocole de préparation des échantillons (MSD®). Différentes hypothèses peuvent expliquer ces résultats différentiels : 1) les souris 3xTg-AD présentent la pathologie Tau en plus de la pathologie amyloïde. Même si les liens entre Tau (et sa phosphorylation) et la production d'A β restent débattus, il semble que ces deux mécanismes pathologiques s'influencent de façon réciproque. Il a par exemple été montré que la présence de Tau augmente le nombre de plaques amyloïdes dans un modèle de souris APP croisées avec des souris surexprimant la protéine Tau humaine sauvage (Jackson et al., 2016). Inversement, l'A β augmente l'agrégation de Tau (Bennett et al., 2017; Mattsson-Carlgren et al., 2020). La présence simultanée des deux mécanismes pathologiques dans le modèle 3xTg, reflétant la pathologie humaine, pourrait donc influencer la production, l'agrégation ou la clairance des peptides A β . 2) Le type de mutation dans la PS1 est différente entre les modèles (3xTg : mutation knockin M146V ;

APP : délétion de l'exon 9) et de nombreuses études génomiques montrent l'importance des mutations dans la pathogénèse de la MA (Rosenberg et al., 2016). 3) Les promoteurs des constructions génétiques sont différents (3xTg : Thy-1 ; APP : PrP) et entraînent une expression des transgènes et une répartition spatiale spécifique de la pathologie amyloïde comme dans le modèle 3xTg où les plaques amyloïdes sont particulièrement abondantes dans le subiculum alors que dans les souris APP, les plaques sont préférentiellement situées dans le cortex et l'hippocampe. 4) le sexe est différent avec des souris APP mâles et des souris 3xTg femelles. L'influence du sexe dans la MA est essentielle puisque le sexe ratio penche vers les femmes (Ullah et al., 2019). Dans les modèles animaux, les femelles développent plus précocement et/ou de façon plus sévère les symptômes, en particulier les souris 3xTg. 5) le fond génétique des deux modèles n'est pas identique (3xTg : C57BL6x129S ; APP : C57BL/6J), ce qui peut par exemple influencer le comportement des souris (Pardossi-Piquard et al., 2016).

Ainsi, la plupart de ces différences expliquent probablement une partie des effets différentiels de SOCS3 dans ces 2 modèles. Mais une hypothèse émergente de plus en plus documentée aujourd'hui, est la faculté de la réactivité astrocytaire à être dépendante du contexte pathologique. De nombreuses études émergentes sont en effet en faveur d'une hétérogénéité de la réactivité astrocytaire à des niveaux morphologiques, moléculaires, de signalisation et fonctionnels (Anderson et al., 2014; Escartin et al., 2019; Matias et al., 2019), voir introduction partie II.4). Ces études démontrent que la réactivité astrocytaire n'est pas stéréotypée, voire même que certaines classes d'astrocytes réactifs apparaissent dans des contextes pathologiques précis (Habib et al., 2020; Liddelow et al., 2017).

Ainsi, au commencement des études de notre équipe sur le rôle des astrocytes réactifs dans la MA, ces concepts d'hétérogénéité étaient moins connus et explorés. Aujourd'hui, la nature diversifiée des astrocytes réactifs nous incite à considérer l'existence de classes d'astrocytes réactifs différentes dans les MND, différentes entre deux modèles d'une même maladie voire au sein d'une même région et d'un même contexte pathologique. On peut alors imaginer que la voie JAK2-STAT3 agit sur des astrocytes réactifs différents entre les modèles APP et 3xTg, ce qui expliquerait la diversité des effets de la modulation de la voie par SOCS3 dans ces deux modèles (**Figure 38**). En effet, en considérant les principaux résultats obtenus dans les articles 1 et 2 : 1) universalité de la voie JAK2-STAT3 dans les MND, 2) activation nécessaire et suffisante de la voie, 3) action de la voie en tant que master régulateur au-delà d'éventuelles classes d'astrocytes réactifs de type A1 et A2 et 4) diversité de la modulation par SOCS3 en fonction du contexte pathologique et en les percevant à travers une vision des astrocytes réactifs comme hétérogènes, nous pouvons établir un modèle hypothétique (**Figure 38**) dans lequel la voie JAK2-STAT3 agirait à une étape précoce de la réactivité sur différents astrocytes entre les modèles APP et 3xTg dont la réactivité serait ensuite modulée par des acteurs contexte-dépendants, comprenant d'autres voies de signalisation comme la voie NF- κ B par exemple.

Ainsi, la réactivité astrocytaire est un phénomène complexe, sensible au contexte qui nous invite à explorer l'hétérogénéité des astrocytes réactifs dans la MA pour comprendre leurs effets. Nous avons donc choisi d'étudier l'hétérogénéité des astrocytes réactifs, et en particulier les cascades de signalisation qui les contrôlent, dans le modèle APP par différentes approches exploratoires. La perspective finale de ce projet étant d'identifier des classes délétères de la MA afin de pouvoir spécifiquement les cibler, nous avons choisi le modèle APP puisque la modulation des astrocytes réactifs par SOCS3,

indépendamment de classes d'astrocytes réactifs, semble déjà être prometteuse, en particulier sur les plaques amyloïdes et l'apprentissage.

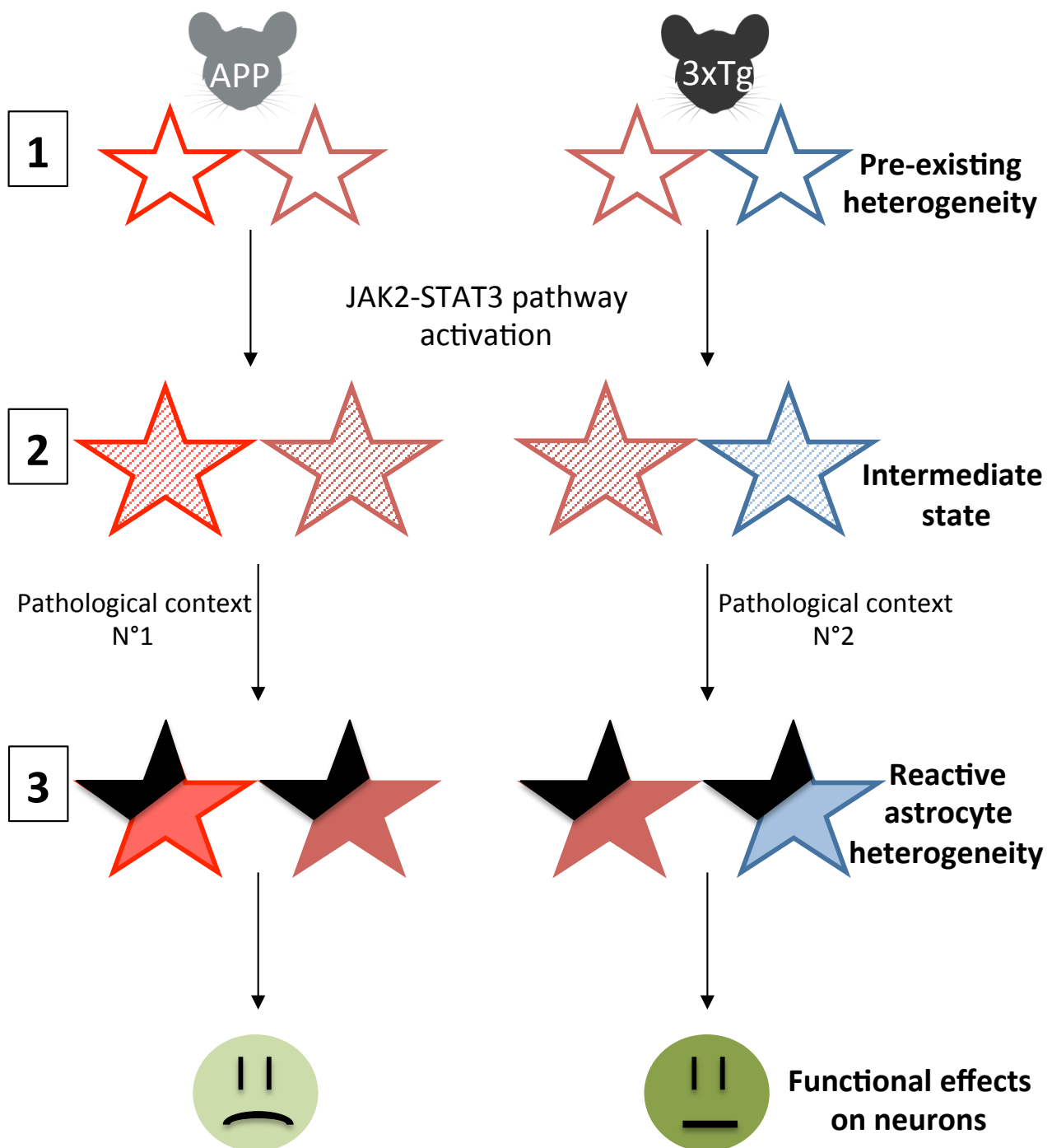


Figure 38. Modèle de l'induction de la réactivité astrocytaire par la voie JAK2-STAT3 chez les souris APP et 3xTg. 1. La voie JAK2-STAT3 agit comme un master régulateur sur les différentes classes d'astrocytes en conditions basales dans les modèles APP et 3xTg (étoiles= astrocytes). L'activation de la voie induit une réactivité de toutes les classes d'astrocytes. 2. En dehors d'un contexte pathologique, ces classes adoptent un profil d'astrocytes réactifs (rayures) intermédiaires mais la présence d'un environnement et un contexte pathologique spécifique entre les astrocytes de souris APP et 3xTg affine /module cette réactivité. 3. Les astrocytes réactifs subissent alors des changements morphologiques (taille de l'étoile) et moléculaires (couleur pleine) communs mais également des changements moléculaires spécifiques à chaque classe (couleur). Les classes d'astrocytes réactifs de souris APP apparaissent plutôt délétères sur les neurones alors que les classes d'astrocytes réactifs de souris 3xTg ont des effets plus modérés (ronds= neurones). Notre outil de blocage de la signalisation JAK2-STAT3 par SOCS3 agirait sur toutes ces classes d'astrocytes réactifs à l'étape 2 ou 3.

III. Comment évaluer et quantifier l'hétérogénéité des astrocytes réactifs ?

1. Nécessité des approches d'exploration à l'échelle cellulaire

L'exploration de l'hétérogénéité des astrocytes réactifs est une question délicate car elle nécessite des outils spécifiques permettant des analyses à l'échelle d'un astrocyte. En effet, comment peut-on identifier une hétérogénéité par des stratégies étudiant le profil moyen d'une population ? C'est d'ailleurs le cas de notre étude du rôle des astrocytes réactifs dans la MA qui a démarré il y a plusieurs années et qui se base sur des techniques comme le RNAseq 'bulk' sur astrocytes triés ou encore l'enregistrement des potentiels post-synaptiques de champ en électrophysiologie.

L'utilisation de méthodes basées sur le séquençage de cellules ou noyaux uniques a permis de montrer la complexité des astrocytes réactifs dans plusieurs maladies. Des études récentes ont identifiées des sous-populations moléculaires d'astrocytes réactifs dans la MA (Grubman et al., 2019; Habib et al., 2020; Mathys et al., 2019) mais également dans la maladie de Huntington (Al-Dalahmah et al., 2020) et dans la SEP (Wheeler & Quintana, 2019). Les avantages majeurs de ces techniques sont de pouvoir identifier de nouveaux marqueurs de classes d'astrocytes réactifs sans a priori et à l'échelle du génome entier. Le séquençage sur noyaux uniques permet en particulier une étude chez l'Homme car il peut être réalisé à partir d'échantillons congelés, permettant de travailler sur des tissus archivés. Néanmoins, le séquençage sur noyaux uniques ne détecte que la moitié des transcrits du noyau, notamment du à la faible abondance de l'ARN nucléaire. De plus, certaines expériences analysent un faible nombre d'astrocytes, ce qui limite l'identification de sous-populations d'astrocytes. De plus, ces techniques entraînent une perte de l'information spatiale ne permettant pas de détecter d'éventuels liens entre la signature moléculaire des astrocytes réactifs et leur environnement (Hirbec et al., 2020). Pour pallier cette limitation, des techniques comme la transcriptomique spatiale permettent d'analyser le transcriptome d'astrocytes uniques *in situ* (Bayraktar et al., 2020; Chen et al., 2019).

De nombreux autres techniques permettent d'étudier les astrocytes réactifs à l'échelle cellulaire comme le FACS, l'*hybridation in situ*, l'immunohistochimie, l'électrophysiologie en 'patch' ou encore l'utilisation de la microcopie permettant de suivre les cellules dans leur environnement à l'aide de rapporteurs fluorescents ou d'indicateurs calciques par exemple (Guttenplan & Liddelow, 2019; Hirbec et al., 2020). Cette liste n'est pas exhaustive et l'engouement pour l'hétérogénéité des cellules gliales et leurs potentiels thérapeutiques ne feront probablement qu'accroître l'apparition de nouvelles techniques d'études dans les années à venir.

2. Limitations des marqueurs moléculaires de l'hétérogénéité

L'autre point délicat de l'exploration de l'hétérogénéité des astrocytes réactifs est la nécessité de disposer de marqueurs de cette hétérogénéité. En effet, comment identifier des classes d'astrocytes réactifs et étudier leurs fonctions si on ne dispose pas de marqueurs ? Le moyen de s'affranchir de cette limitation est d'utiliser des techniques sans a priori, comme l'analyse transcriptomique à l'échelle du génome entier, qui elles, permettent au contraire d'identifier des marqueurs enrichis dans une population, sous

population ou une maladie. Dans ce sens, l'étude de Zamanian et al., est intéressante car elle a permis d'identifier une signature moléculaire propre à un contexte pathologique, l'ischémie et la neuroinflammation induite par l'injection de LPS (Zamanian et al., 2012). Il serait intéressant de réaliser une étude similaire dans d'autres contextes pathologiques pour identifier des marqueurs spécifiques de chaque maladie. L'étude de Zamanian et al., a conduit les auteurs à proposer un modèle dans lequel les astrocytes adoptent un phénotype réactif de type A1 synaptotoxique après exposition au LPS et un phénotype réactif de type A2 supposé neuroprotecteur en cas d'ischémie (Liddelow et al., 2017). Cette classification a suscité un grand intérêt notamment car il s'agit de la première à avoir défini une dizaine de marqueurs propres à chaque classe dont certains comme C3, ont ensuite été étudiés, presque systématiquement, dans les études sur les astrocytes réactifs, y compris dans notre étude (Article 1 et données non montrées) (Clarke et al., 2018; Fujita et al., 2018; Miyamoto et al., 2020; Neal et al., 2018; Reichenbach et al., 2019; Yun et al., 2018). Cependant, cette dichotomie semble aujourd'hui un peu restrictive et d'autres études sur l'hétérogénéité des astrocytes réactifs, en particulier les études de transcriptomique à l'échelle du génome entier, suggèrent que la réponse est plus complexe et implique plus que deux états de réactivité (Al-Dalahmah et al., 2020; Mathys et al., 2019). Notamment, dans notre étude (Article 1), nous avons montré que des marqueurs de type A1 et A2 coexistent chez les souris APP, de même que chez les patients MA (Mathys et al., 2019). Ce profil mixte A1/A2 est aussi retrouvé dans des modèles de tauopathies (Litvinchuk et al., 2018), dans la maladie de Huntington (Diaz-Castro et al., 2019) ou dans la SLA (Sun et al., 2015; Tyzack et al., 2017). Enfin, ces marqueurs coexistent aussi dans un même astrocyte dans l'ischémie (Liddelow et al., 2017) ou durant le vieillissement normal (Clarke et al., 2018). D'autre part, le phénotype synaptotoxique des astrocytes réactifs de type A1 a été principalement réalisé *in vitro* et nécessite d'être confirmé par d'autres études *in vivo*. La signature moléculaire des astrocytes réactifs de type A2 semble bénéfique (expression de facteurs trophiques de gènes de la synaptogénèse) mais en réalité aucune étude fonctionnelle n'a été effectuée pour le confirmer. Ainsi, une multitude de classes d'astrocytes réactifs pourraient exister, en particulier si on tient compte, des conditions *in vivo* qui sont plus complexes et diversifiées comme il a été souligné par les propres auteurs de cette étude (Liddelow & Barres, 2017). En particulier, on ne sait pas comment ces différentes classes d'astrocytes réactifs sont générées.

Ainsi, il est aujourd'hui communément admis que la réactivité astrocytaire n'est pas une réponse stéréotypée et que différentes classes moléculaires et fonctionnelles d'astrocytes réactifs pourraient influencer différemment les neurones environnants et *in fine* avoir différents impacts sur la maladie. Mais les signaux et cascades de signalisation qui contrôlent cette diversité ne sont pas identifiés. Notre émettons donc l'hypothèse que les différentes classes d'astrocytes réactifs sont contrôlées par différentes cascades de signalisation qui conditionnent l'acquisition d'un profil moléculaire unique et des fonctions spécifiques à chaque classe (**Figure 39**).

Pour tester cette hypothèse, nous avons décidé de nous affranchir des limitations liées aux marqueurs de l'hétérogénéité en utilisant une approche originale basée sur la détection du niveau d'activation de 2 cascades de signalisation afin d'étudier l'hétérogénéité moléculaire et fonctionnelle liées à ces cascades.

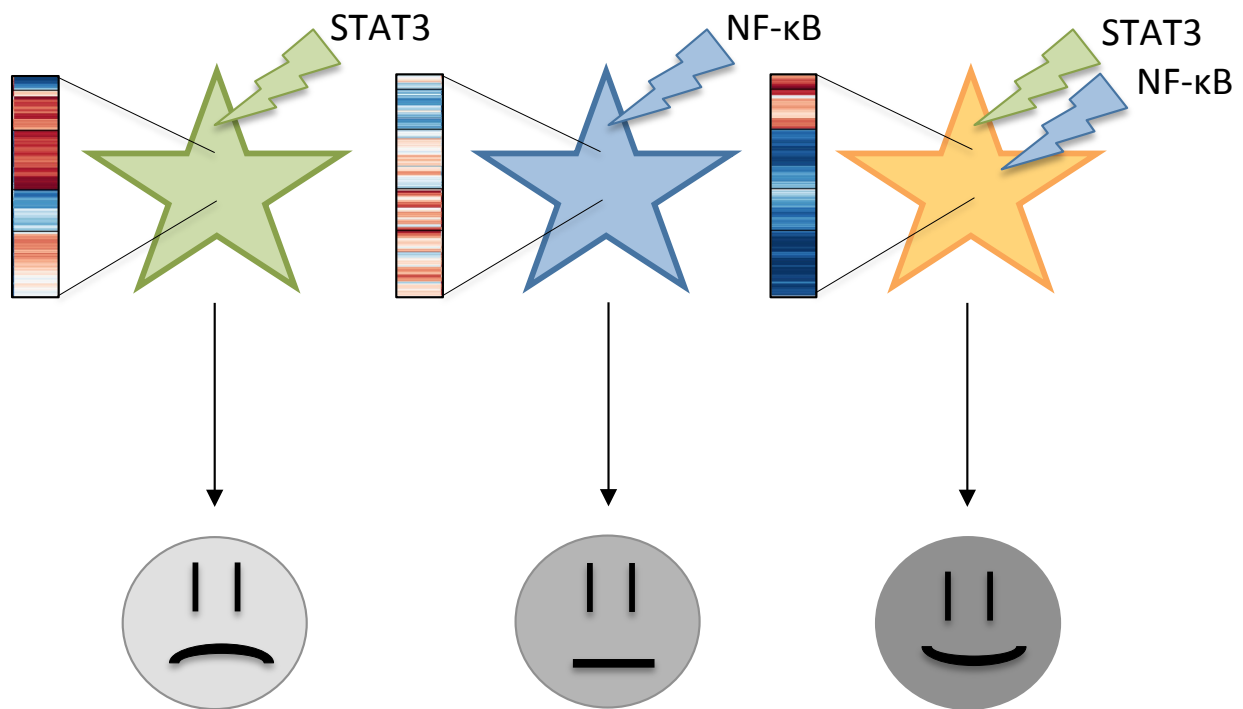


Figure 39. Hypothèse de travail. La réactivité est déclenchée par différentes cascades de signalisation (schématisées par les éclairs) dans les astrocytes (étoiles). Ceci entraîne l'expression de profils géniques différents entre les classes d'astrocytes réactifs (schéma signature génique à gauche des étoiles). Certaines de ces classes ont potentiellement des effets bénéfiques ou délétères sur les neurones (ronds= neurones).

3. Avantages et limites des systèmes rapporteurs des voies de signalisation JAK2-STAT3 et NF- κ B

Afin de pouvoir suivre l'activation des cascades de signalisation, nous avons généré des rapporteurs de voies de signalisation. Ces rapporteurs associent un élément de réponse à un facteur de transcription (SRE ou NRE) et une protéine fluorescente (GFP ou Tomato et CFP) et sont intégrés dans des vecteurs lentiviraux pseudotypés Mokola. En particulier, nous avons généré un rapporteur permettant de mesurer l'activation de la voie STAT3, appelé SRE-GFP ou SRE-Tomato en fonctions des besoins de l'expérience, et un rapporteur permettant de mesurer l'activation de la voie NF- κ B, appelé NRE-CFP (Figures 26 et 34).

3.1. Les systèmes rapporteurs permettent un accès direct à la signalisation

Ces systèmes rapporteurs sont originaux et permettent de suivre l'activation des voies, *in situ*, et de connaître directement les cascades de signalisation associées à des classes d'astrocytes réactifs. Ceci n'est pas le cas avec des stratégies comme le RNAseq sur astrocytes uniques car les voies de signalisation associées aux différentes sous-populations sont inférées bio-informatiquement par des analyses visant à identifier les master régulateurs ou les facteurs de transcription associés aux gènes différentiellement exprimés, ce qui nécessite une validation expérimentale.

3.2. Les rapporteurs lentiviraux sont des outils versatiles et sélectifs

Les vecteurs lentiviraux sont couramment utilisés pour cibler les astrocytes *in vivo* car ils présentent de nombreux avantages (Delzor et al., 2013; Colin et al., 2009). Ces outils sont versatiles et permettent un contrôle spatial et temporel par injection dans la région souhaitée à un temps donné et dans plusieurs modèles et espèces. L'utilisation de souris transgéniques permettant l'expression d'une protéine fluorescente fusionnée à la protéine NF- κ B ou STAT3 pourrait être envisagée car ces lignées transgéniques existent déjà, comme les souris NF- κ B-GFP-luciférase (Everhart et al., 2006) ou les souris STAT3-luciférase (Chen et al., 2012) mais il serait nécessaire à la fois de les croiser entre elles mais aussi avec une lignée de souris transgéniques de la MA pour étudier ces voies dans le contexte de la réactivité astrocytaire. Contrairement à notre stratégie, ce processus serait donc long et coûteux et le croisement de ces différentes lignées pourrait impacter le développement des symptômes de la maladie. Un autre avantage majeur de notre stratégie par rapport aux souris transgéniques est la capacité de pouvoir construire nos vecteurs 'à la carte' en modifiant les protéines fluorescentes rapportrices (comme nous avons du le faire avec SRE-GFP et SRE-Tomato), le promoteur ou en ajoutant une séquence d'adressage/d'exclusion au noyau. Dans nos expériences, le vecteur NRE-CFP possède d'ailleurs une séquence d'adressage au noyau afin de bien distinguer le signal de la GFP dans le cytoplasme du signal de la CFP dans le noyau. De façon intéressante, nous avons validé la robustesse du rapporteur NRE-CFP puisque son utilisation dans deux expériences différentes (analyse de gènes en qPCR et analyse fonctionnelle avec les sondes de protéolyse) révèle des pourcentages d'astrocytes NF- κ B⁺ relativement similaires (qPCR : 0.11% d'astrocytes NF- κ B⁺; analyse fonctionnelle : 0.21% d'astrocytes NF- κ B⁺).

Nos vecteurs viraux présentent une sélectivité importante et cruciale pour les astrocytes grâce à l'enveloppe Mokola (Deltzor et al., 2013; Colin et al., 2009). Le tropisme astrocytaire a été vérifié dans nos expériences (**Figure 30**). L'absence d'une neuroinflammation majeure provoquée par les lentivirus a été vérifiée dans le laboratoire par comparaison d'animaux injectés avec un lentivirus contrôle et non injectés (Escartin et al., 2006; Ben Haim et al., 2015; Lavis et al., 2012). L'équipe de la plateforme de production virale travaille d'ailleurs toujours sur l'optimisation de la production des virus, en particulier, de leur purification, pour réduire l'inflammation à son minimum.

Après avoir validé la sélectivité de nos rapporteurs lentiviraux, nous avons également regardé la sensibilité du rapporteur SRE-GFP à la voie STAT3. Pour cela, nous avons activé la voie à l'aide de d'un vecteur codant pour JAK2ca et nous avons vérifié que les niveaux de la protéine rapportrice GFP augmentent bien dans cette condition, témoignant d'une activation du SRE. Nous avons également vérifié l'accumulation nucléaire de STAT3 en immunohistochimie dans les astrocytes SRE-GFP+ sur des coupes de souris injectées avec ce rapporteur (**Figure 30**). Néanmoins, la caractérisation de la sensibilité à la voie NF- κ B reste à explorer car nous n'avons pas réussi à mettre au point un marquage NF- κ B (ou d'autres intermédiaires de la voie) en immunohistochimie.

Profitant de la versatilité de nos outils et de la facilité de mise en œuvre de nouveaux vecteurs, ce projet a pour perspectives d'étudier d'autres voies de signalisation impliquées dans la réactivité astrocytaire comme la voie CN/NFAT par exemple. Afin d'éviter la co-injection de plusieurs virus et de favoriser le multiplexage de voies de signalisations évaluées simultanément, il a aussi été envisagé d'assembler tous les rapporteurs de voies de signalisation au sein d'une construction unique. Cependant, l'équipe a rencontré des difficultés dans la construction moléculaire probablement dues à des problèmes d'interférences des séquences promotrices entre elles. De même, la production des vecteurs viraux contenant cette construction est difficile, probablement du aux étapes de synthèse du virus (encapsidation d'un génome long et complexe, difficulté de synthèse du génome viral, ...).

3.3. Les rapporteurs lentiviraux sont compatibles avec d'autres explorations

Notre stratégie est compatible avec d'autres techniques permettant de caractériser les effets de l'activation des voies de signalisation au niveau moléculaires et fonctionnelles. En histologie, ces rapporteurs peuvent par exemple être combinés à d'autres marquages fluorescents. Il est aussi possible de trier les populations exprimant ces rapporteurs par FACS afin de pouvoir réaliser différentes analyses moléculaires de type qPCR ou RNAseq. L'exploration d'autres marqueurs membranaires peut aussi être réalisée par marquage avec des anticorps en FACS. Nous avons d'ailleurs commencé à mettre au point des marqueurs décrits de sous classes (CD51, CD71, John Lin et al., 2017) ou des marqueurs d'astrocytes réactifs (H2-D1, CD14, Liddel et al., 2017). Enfin, au niveau fonctionnel, les rapporteurs lentiviraux sont compatibles avec des méthodes de suivi longitudinal des astrocytes réactifs ou de leur réponse calcique, en microscopie bi-photonique par exemple. Au contraire, des stratégies basées sur des combinaisons de marqueurs des astrocytes réactifs et nécessitant une fixation du tissu ne sont pas compatibles avec d'autres explorations fonctionnelles.

Ainsi, les rapporteurs des voies de signalisation apparaissent comme des outils attractifs pour l'exploration de l'hétérogénéité des astrocytes réactifs. La perspective d'utilisation de la microscopie bi-photonique (voir paragraphe IV.1) sur des souris injectées avec ces rapporteurs permettra de mieux caractériser la dynamique de la réponse et la sensibilité des rapporteurs.

3.4. Limites des systèmes rapporteurs

Les rapporteurs lentiviraux ne permettent de suivre que localement l'activation des voies de signalisation puisque leur expression est limitée à la zone d'injection. Il serait possible d'étudier une zone plus étendue en réalisant des points d'injections multiples. De part l'injection de virus directement dans le cerveau, cette stratégie est plus invasive que l'utilisation de lignées transgéniques exprimant des rapporteurs par exemple. Un point important de l'utilisation de vecteurs lentiviraux est la nécessité de contrôler que l'infection par les virus n'est pas stochastique. Afin de s'assurer que nos vecteurs infectent bien tous les astrocytes et donc que l'absence d'expression de la protéine fluorescente rapportrice dans un astrocyte est bien due à l'absence d'activation des voies STAT3 ou NF- κ B et non pas à l'absence du rapporteur, nous avons injecté des lentivirus contrôles de promoteur ubiquitaire, PGK-GFP et PGK-Tomato dans le PFC. Nous avons montré que les protéines rapportrices GFP et Tomato, associées aux virus de promoteur PGK, sont co-exprimées à plus de 90%, témoignant que l'expression de nos rapporteurs SRE-GFP et NRE-CFP est bien liée à l'activité du promoteur sensible aux cascades (**Figure 31**). La perspective de ce projet est d'utiliser la construction PGK-Tomato en co-injection avec les rapporteurs SRE-GFP et NRE-CFP afin de pouvoir identifier tous les astrocytes infectés. Malgré l'utilisation de ce lentivirus contrôle, nous ne pouvons pas exclure un mécanisme d'expression ou de dégradation différentiel en fonction des protéines fluorescentes. En effet, les protéines fluorescentes ont des structures tridimensionnelles communes mais leur propriété de stabilité et de brillance peuvent être différentes (Cranfill et al., 2016). Néanmoins, nous avons montré que le pourcentage d'astrocytes STAT3⁺ est du même ordre de grandeur lorsque le rapporteur est associé à deux protéines rapportrices fluorescentes différentes (0.32% d'astrocytes SRE-Tomato⁺ mesurés dans les expériences fonctionnelles avec les sondes protéasome et cathepsine et 0.85% d'astrocytes SRE-GFP⁺ triés par FACS pour les expériences de qPCR). Afin de comparer directement l'expression de protéines fluorescentes rapportrices différentes associées au même élément de réponse, nous avons injecté une cohorte avec les rapporteurs SRE-GFP/NRE-CFP dans un hémisphère et les rapporteurs SRE-Tomato/NRE-CFP dans l'autre.

IV. La signalisation STAT3 et NF- κ B révèle des classes d'astrocytes moléculairement et fonctionnellement différentes dans le cortex préfrontal de souris APP/PS1dE9

1. L'expression des voies de signalisation n'est pas homogène dans les astrocytes réactifs

Afin d'étudier l'activation des voies de signalisation STAT3 et NF- κ B, les rapporteurs SRE-GFP et NRE-CFP ont été injectés dans le PFC de souris APP.

Nous avons montré que ces voies de signalisation étaient activées, *in situ*, dans les astrocytes réactifs, témoignant à nouveau de l'importance de ces voies de signalisation dans la réactivité astrocytaire. Mais de manière intéressante, l'activation de ces voies est hétérogène et met en évidence des classes d'astrocytes réactifs différents : astrocytes STAT3⁺, NF- κ B⁺ ou STAT3⁺/NF- κ B⁺ (**Figure 31**). L'abondance plus élevée des classes associées à l'activation de STAT3 (STAT3⁺ et STAT3⁺/NF- κ B⁺) est en accord avec l'importance de la voie JAK2-STAT3 dans la réactivité astrocytaire, comme précédemment montré dans notre étude. Dans les souris WT, ces 3 classes sont également observées mais en nombre globalement plus faible, témoignant de la suractivation des voies STAT3 et NF- κ B en conditions pathologiques (**Figure 31**).

Cette hétérogénéité de signalisation est peu étudiée dans le contexte des MND mais est aussi observée dans des modèles de lésion de la moelle ou du cortex dans lesquels seuls les astrocytes réactifs proches de la lésion sont associés à la signalisation STAT3 (Wanner et al., 2013a) ou N-cadhérine (Hara et al., 2017) ou EphB1-STAT3 (Tyzack et al., 2017).

Il serait intéressant de confirmer l'activation de ces voies STAT3 et NF- κ B par des méthodes complémentaires. Nous essayons par exemple de mettre au point le marquage de la sous-unité p65 en immunohistochimie que nous pourrions combiner avec un marquage de STAT3, accumulé au niveau nucléaire lors de l'activation de la voie (**Figure 30**). Il serait plus direct d'étudier les formes phosphorylées actives de STAT3 et p65 mais ces formes sont difficilement détectables dans des modèles chroniques de MND (Ben Haim, et al., 2015). Une technique alternative consisterait à purifier les noyaux afin de pouvoir marquer les facteurs de transcription accumulés à l'aide d'anticorps. La fluorescence émise par les facteurs de transcription marqués est ensuite mesurée par FACS (Marion-Poll et al., 2014). Cette méthode présente l'avantage de pouvoir à la fois identifier les facteurs de transcription mais également trier les noyaux pour en extraire l'ARN nucléaire et l'étudier en qPCR ou en transcriptomique. De plus, cette méthode permet de combiner plus de marquages qu'en histologie en fonction des détecteurs présents sur le cytomètre. Au cours de ma thèse, j'ai commencé à mettre au point cette méthode, mais pour l'instant nous n'avons pas de méthode satisfaisante pour identifier spécifiquement le noyau des astrocytes et le distinguer des autres noyaux.

De manière surprenante, nous n'avons pas mis en évidence des règles topographiques évidentes de la répartition des astrocytes par rapport à leur environnement. Par exemple, les astrocytes STAT3⁺ et NF- κ B⁺ semblent être tous deux présents autour des plaques amyloïdes. Cependant, nous savons que la présence des plaques, influence les astrocytes environnants qui ne présentent pas le même profil moléculaire que les astrocytes à distance des plaques (Chen et al., 2019; Orre et al., 2014a). Nous sommes actuellement en train de confirmer la répartition des populations d'astrocytes réactifs par un autre marquage des plaques amyloïdes. De façon qualitative,

nous observerons une tendance au regroupement des astrocytes STAT3⁺ entre eux, de même pour NF-κB mais ceci nécessite une évaluation quantitative. Si cette tendance se confirme, elle serait en accord avec les études récentes suivant le développement de clones astrocytaires par la méthode « Star track » et montrant que la majorité des astrocytes réagissent de manière semblable à un stimulus pathologique (Bribian et al., 2018).

Notre étude *postmortem*, ne permet pas d'explorer le décours temporel de l'activation de ces cascades de signalisation (à moins de sacrifier plusieurs cohortes de souris à différents temps) et il serait intéressant d'utiliser ces outils rapporteurs *in vivo*, en imagerie bi-photonique longitudinale. Cette technique pourrait facilement être mise en œuvre dans le PFC par l'intermédiaire d'une fenêtre crânienne. Elle nous permettrait de davantage comprendre l'activation et la répartition de ces classes dans le temps et dans l'espace, notamment entre les différentes couches du cortex puisque les astrocytes des couches supérieures et profondes du cortex sont différents (Lanjakornsiripan et al., 2018; Bayrakatar et al., 2020) ou en relation avec la formation des plaques. L'aspect temporel est également primordial puisque les expériences d'imagerie bi-photonique nous permettraient d'établir si l'activation des voies STAT3 ou NF-κB se fait de façon transitoire ou successive. En effet, une façon de réconcilier le rôle master régulateur de STAT3 (Figure 38) et l'apparition d'une classe d'astrocytes réactifs NF-κB⁺ seule est de formuler l'hypothèse d'une activation 'primaire' par STAT3 et une activation 'secondaire' par d'autres voies de signalisation contexte-dépendantes, dont NF-κB.

Des expériences pilotes menées en collaboration avec le Dr F. Gambino à Bordeaux montrent que ces rapporteurs SRE-GFP peuvent être suivis par imagerie bi-photonique dans les astrocytes rendus réactifs par une lésion aigue. Des demandes de financement sont en cours pour réaliser cette étude de manière systématique.

2. L'expression des voies de signalisation est associée à une signature moléculaire dans les astrocytes réactifs

En triant ces trois classes de signalisation d'astrocytes réactifs par FACS, nous avons pu étudier leurs profils moléculaires et nous avons montré que chaque classe est associée à un profil spécifique (Figures 32 et 33). Parmi les gènes exprimés de façon ubiquitaire entre les astrocytes STAT3⁺, NF-κB⁺ et STAT3⁺/NF-κB⁺, on trouve *ApoE*, *H2-D1* et *Ctss*. La présence d'*ApoE* n'est pas surprenante car il est majoritairement exprimé par les astrocytes. Alors que nous n'avons pas observé de changements de son expression dans notre étude transcriptomique sur les astrocytes hippocampique de souris APP, son expression est fortement diminuée dans les astrocytes réactifs au cours de la MA dans d'autres études (Mathys et al., 2019; Orre, et al., 2014a). De manière intéressante, *H2-D1* est un marqueur des astrocytes de type A1 décrit par Liddelow et al (Liddelow et al., 2017), ce qui témoigne à nouveau de la limite d'utilisation de ces marqueurs pour décrire une sous classe unique, car son expression n'est pas liée à une cascade de signalisation spécifique (en particulier NF-κB) comme parfois suggéré par cette équipe (Liddelow & Barres, 2017). Enfin, *Ctss* codant pour la cathepsine S une enzyme lysosomale impliquée dans la dégradation des protéines est aussi exprimé à des niveaux équivalents dans les 3 classes. L'étude de Mathys et al, souligne en effet l'importance des systèmes de protéostasie dans la MA en montrant que plusieurs gènes appartenant à ces systèmes, dont la *Ctss* sont surexprimés dans l'ensemble des types cellulaires du cerveau (Mathys et al., 2019).

Les astrocytes réactifs STAT3⁺ sont enrichis en gènes impliqués dans les fonctions homéostatiques des astrocytes comme *Glul*, *Slc1a2*, *Gjb6* et *Aqp4* ou en gènes classiquement induits au cours de la réactivité comme *Gfap* et *Serpina3n*. Ces résultats sont en accord avec un rôle central de la voie JAK2-STAT3 dans la réactivité mais il est important de souligner que les astrocytes STAT3⁺ représentent un plus grand nombre d'astrocytes triés étudiés (en moyenne 4700 astrocytes) par rapport aux deux autres catégories (environ 470 astrocytes NF-κB⁺ et 190 astrocytes STAT3⁺/NF-κB⁺). Il est donc possible que ces gènes ne soient pas détectés dans les autres classes car leur expression est en dessous de la limite de détection. Cependant, les ARNm des 3 classes ont tous été amplifiés et une quantité équivalente de cDNA a été utilisée pour chaque classe dans les astrocytes en qPCR. Enfin, des gènes peu exprimés sont tout de même détectés dans la classe d'astrocytes NF-κB⁺ et STAT3⁺/NF-κB⁺ (*H2-D1*, *Ctss*). En plus des gènes exprimés en communs entre les 3 classes d'astrocytes réactifs, nous avons identifié *Cd14* comme spécifique des 2 classes d'astrocytes réactifs NF-κB⁺ et STAT3⁺ mais nous n'avons pas identifié de marqueur spécifique dans les astrocytes réactifs STAT3⁺/NF-κB⁺. La limitation majeure de notre étude est donc le faible nombre d'astrocytes étudiés dans chacune des catégories, en particulier dans les classes d'astrocytes réactifs NF-κB⁺ et STAT3⁺/NF-κB⁺. Certains des gènes étudiés sont d'ailleurs indétectables ou trop faiblement exprimés pour être correctement quantifiés par qPCR (*Kcnj10*, *Ube2k*, *Gja1* et *H2-T23*). D'autre part, notre protocole inclut une amplification des ARNm, seule méthode compatible avec les faibles quantités d'ARNm initiales mais qui induit néanmoins une variabilité. Il sera donc important de confirmer ces résultats en histologie, grâce à des protocoles déjà validés (*Cd14*, *Aqp4*, *ApoE*). Ces expériences sont en cours.

En comparant le nombre d'astrocytes de chaque classe évalué en histologie ou isolé en FACS (histologie : ≈1200 astrocytes STAT3⁺, ≈800 astrocytes NF-κB⁺ et ≈1200 astrocytes double⁺ ; FACS : ≈4700 astrocytes STAT3⁺, ≈470 astrocytes NF-κB⁺ et ≈190 astrocytes double⁺), on observe un nombre relativement similaire pour les astrocytes STAT3⁺ (car pool de 3 souris pour le FACS) mais les autres classes semblent sous-estimées en FACS. En effet, le protocole de dissociation des cellules pour l'analyse en FACS induit davantage de perturbations entraînant la perte de cellules alors que le tissu est préservé en histologie. Le nombre de cellules de chaque classe est donc probablement mieux estimé en histologie.

Idéalement, une analyse à l'échelle du génome entier par RNAseq des 3 classes de signalisation d'astrocytes réactifs aurait été plus adaptée pour explorer la signature moléculaire de chaque classe, sans a priori et identifier des gènes non connus.

Les gènes précédemment étudiés ont aussi été mesurés chez les souris WT (**Figure supplémentaire 1**). Nous n'avons pas mis en évidence de différences significatives de l'expression de ces gènes entre les souris WT et les souris APP. La variabilité intrinsèque de cette étude rend difficile l'observation de différentes signatures entre génotype ou classes d'astrocytes réactifs. De nouveau, l'inclusion d'un plus grand nombre de souris permettra de renforcer les résultats de cette étude.

3. L'expression des voies de signalisation est associée à des fonctions spécifiques dans les astrocytes réactifs

Nous avons exploré, dans les astrocytes réactifs STAT3⁺ et NF-κB⁺, les deux voies majoritaires impliquées dans la protéostasie : le protéasome et la dégradation par les cathepsines des lysosomes au cours de l'autophagie (Yan Wang & Le, 2019). En effet, une étude de l'équipe par microarray sur des astrocytes triés exprimant JAK2ca en dehors de tout contexte pathologique a révélé une surexpression de gènes liés à ces systèmes de protéolyse dans les astrocytes réactifs induits par JAK2ca. En particulier, des gènes liés aux cathepsines comme *Ctss* et *Ctsc* ou au protéasome sont surexprimés dans les astrocytes réactifs (données non montrées ; Abjean et al, en préparation). Dans la MA, les systèmes de protéolyse sont également altérés (Jansen et al., 2014; Li et al., 2017) et une surexpression de gènes impliqués dans ce processus est observée, y compris dans les astrocytes (Mathys et al., 2019). Cependant, le rôle des astrocytes réactifs dans ces processus reste à déterminer.

Laurene Abjean, une ancienne doctorante de l'équipe, a développé l'utilisation de sondes fluorescentes fonctionnelles permettant de mesurer l'activité du protéasome et des cathepsines sur des cellules uniques par FACS. Ces sondes initialement développées pour des marquages sur tissu fixé ou cellules vivantes (cathepsines : (Withana et al., 2016) ; protéasome : (Berkers et al., 2007)) ont été optimisées pour leur utilisation en FACS. La sonde cathepsine permet en particulier de mesurer l'activité des cathepsines B, L, S et X parmi 11 des cathepsines du lysosome.

Par FACS, nous avons donc étudié ces fonctions dans nos classes d'astrocytes réactifs. Nous avons montré que les astrocytes réactifs STAT3⁺ ont une activité du protéasome plus forte que les astrocytes réactifs NF-κB⁺ qui utilisent davantage les cathepsines des lysosomes (**Figures 35 et 36**). Ces résultats sont intéressants car ils suggèrent une hétérogénéité de l'utilisation des systèmes de protéostasie par différentes classes d'astrocytes réactifs. Il serait nécessaire de valider ces résultats par des méthodes orthogonales comme l'exploration de marquages immunohistologiques de sous-unités du protéasome et de certaines cathepsines. Il est également possible d'utiliser les sondes, in situ, sur tissu congelé mais les expériences réalisées par Laurene Abjean révèlent un bruit de fond très important et incompatible avec une analyse cellulaire précise. De manière surprenante, l'expression de *Ctss* est exprimée à des niveaux équivalents dans les 3 classes en qPCR alors que notre expérience de FACS montre que les cathepsines sont plus actives dans les astrocytes réactifs NF-κB⁺. Il est possible que la cathepsine S soit régulée uniquement au niveau protéique dans les astrocytes réactifs NF-κB⁺ et pas au niveau de l'ARNm comme mesuré par qPCR. De plus, cette sonde mesure une activité globale de plusieurs cathepsines. Il est donc possible que les changements d'activités mesurés ne soient pas dus majoritairement à la cathepsine S.

L'exploration de la protéostasie par des sondes fluorescentes en FACS ne nous a pas permis d'étudier les astrocytes réactifs STAT3⁺/NF-κB⁺ car une importante population autofluorescente se superposait avec ces astrocytes STAT3⁺/NF-κB⁺. Ces populations autofluorescentes sont plus abondantes dans le cerveau des souris âgées (ici 12 mois) (Bertolo et al., 2019). Afin d'exclure cette population, il aurait été nécessaire d'allumer des détecteurs supplémentaires ne correspondant à aucun spectre d'excitation/émission des astrocytes réactifs (Tomato et CFP), ou aux sondes de protéostasie (vert et rouge lointain). En effet, ceci aurait permis de détecter plus facilement les cellules autofluorescentes dans ce canal pour pouvoir les exclure de l'analyse. Cette méthode est classique dans les expériences de cytométrie (Bohn et al., 2015). D'autres méthodes permettent de réduire l'autofluorescence comme l'utilisation du bleu trypan mais cette

méthode n'est compatible qu'avec des cellules fixées (Shilova et al., 2017). Les cellules mortes peuvent également contribuer à l'autofluorescence, d'où la nécessité de l'utilisation d'un marqueur de viabilité (Reichard & Asosingh, 2019). Cependant, nos études pilotes ont montré que notre protocole induit moins de 10% de mort cellulaire.

Dans notre étude, nous avons également réalisé une étude de clusterisation par la méthode t-SNE en combinant les 6 souris APP afin d'augmenter le nombre de cellules totales et donc la puissance de cette analyse à identifier des populations de cellules ressemblantes. Cette analyse permet d'étudier la répartition en 2 dimensions des astrocytes des différentes sous populations parmi les cellules actives pour le protéasome, les cathepsines ou les deux (**Figure 37**). Cette analyse nous a permis de montrer l'existence de plusieurs clusters indépendants entre les astrocytes STAT3⁺ et NF-κB⁺, ce qui valide l'existence de classes d'astrocytes réactifs distinctes entre ces deux voies de signalisation. Néanmoins, chacune de ces populations est elle-même divisée en plusieurs sous clusters, suggérant que la réactivité induite par l'activation d'une seule voie de signalisation pourrait aussi être hétérogène. Au sein d'une classe de signalisation, il pourrait donc y avoir un niveau supplémentaire d'hétérogénéité qui pourrait être lié à l'activation d'autres cascades de signalisations non suivies par nos rapporteurs. Pour étudier ces niveaux additionnels d'hétérogénéité, il serait nécessaire d'augmenter le nombre de cellules étudiées et de suivre l'activation d'autres voies de signalisation impliquées dans la réactivité (paragraphe II.3.2).

Dans l'ensemble, cette étude révèle une hétérogénéité de signalisation STAT3 et NF-κB dans les astrocytes réactifs du PFC de souris APP. Ces signalisations génèrent des classes d'astrocytes réactifs différentes au niveau moléculaire et fonctionnel (**Figure 40**). La perspective de ce projet est d'étudier d'autres fonctions de ces classes d'astrocytes réactifs. En lien avec l'expression de *Slc1a2* spécifiquement dans les astrocytes réactifs STAT3⁺, il serait par exemple intéressant de mesurer la capture de glutamate par les astrocytes réactifs des 3 classes triées en utilisant un analogue du glutamate, l'aspartate tritié (données non publiées du laboratoire). Comme les niveaux d'expression de *Gjb6* sont aussi augmentés dans les astrocytes STAT3⁺, il serait intéressant d'étudier le couplage astrocytaire en tranches par infusion d'une molécule fluorescente diffusible dans les astrocytes.

4. Origine de l'hétérogénéité des astrocytes réactifs ?

Afin d'étudier l'activation des voies JAK2-STAT3 et NF-κB dans les astrocytes en conditions basales, nos outils rapporteurs SRE-GFP et NRE-CFP ont été injectés dans le PFC de souris WT.

Nous avons montré une activation non négligeable de ces voies dans les souris WT, avec une tendance à l'augmentation du nombre d'astrocytes de chaque classe chez les souris APP (**Figure 31**). Une nouvelle cohorte de souris, en cours d'analyse, permettra de confirmer cet effet sur un nombre plus grand de souris. Le fait que les 2 voies soient actives aussi dans les souris WT s'explique par l'importance de ces voies de signalisation dans de nombreuses fonctions astrocytaire en conditions physiologiques (Ceyzériat et al., 2016; Mincheva-Tasheva & Soler, 2013) et peuvent donc avoir une activité basale détectée par ces rapporteurs. On ne peut pas exclure totalement aussi qu'une réactivité

locale due à l'injection ait conduit à l'activation de ces cascades dans les souris WT. L'analyse temporelle par imagerie bi-photonique permettrait de voir si il y a une activation des cascades liée à la chirurgie qui se résoud avec le temps. Les expériences pilotes conduites avec le Dr F. Gambino avec le rapporteur SRE-GFP suggèrent que ce n'est pas le cas et que le niveau d'expression de la GFP est stable au cours du temps (et est même induite après une lésion).

L'étude du profil moléculaire des astrocytes de chaque classe chez les souris WT montre que les gènes exprimés dans les 3 classes de signalisation sont identiques à ceux identifiés chez les souris APP (*ApoE*, *H2-D1* et *Ctss*) (**Figure supplémentaire 1**). D'autres gènes présentent un profil différent de celui des souris APP. Par exemple, *Glu1* est exprimé dans les 3 classes chez les souris WT alors qu'il n'est exprimé que dans les astrocytes réactifs STAT3⁺ dans les souris APP. Mais dans l'ensemble, une hétérogénéité moléculaire est aussi observée dans les souris WT. Au niveau fonctionnel, des résultats similaires sont observés entre les souris WT et APP avec une utilisation préférentielle du protéasome pour les astrocytes WT STAT3⁺ et une utilisation des cathepsines pour les astrocytes WT NF-κB⁺ (**Figure supplémentaire 2**).

Ensemble, ces résultats suggèrent que l'hétérogénéité de signalisation JAK2-STAT3 et NF-κB serait déjà mise en place en condition basale. Ceci corrélait avec de nombreuses études montrant une hétérogénéité des astrocytes en conditions physiologiques au niveau morphologique, moléculaire et fonctionnel (Ben Haim & Rowitch, 2016; Cunningham et al., 2019; Miller, 2018).

Nous pourrions ainsi établir un modèle hypothétique dans lequel différentes classes d'astrocytes existeraient dans un même modèle. En conditions pathologiques, les voies de signalisation STAT3 et NF-κB agiraient sur ces différentes classes pré-existantes pour entraîner des changements moléculaires communs ainsi que l'acquisition d'un profil moléculaire spécifique à chaque classe. Ces changements moléculaires pourraient être affinés/modulés par l'environnement. Enfin, ces signatures moléculaires propres seraient à l'origine de fonctions spécifiques dans chaque classe d'astrocytes réactifs (**Figure 40**).

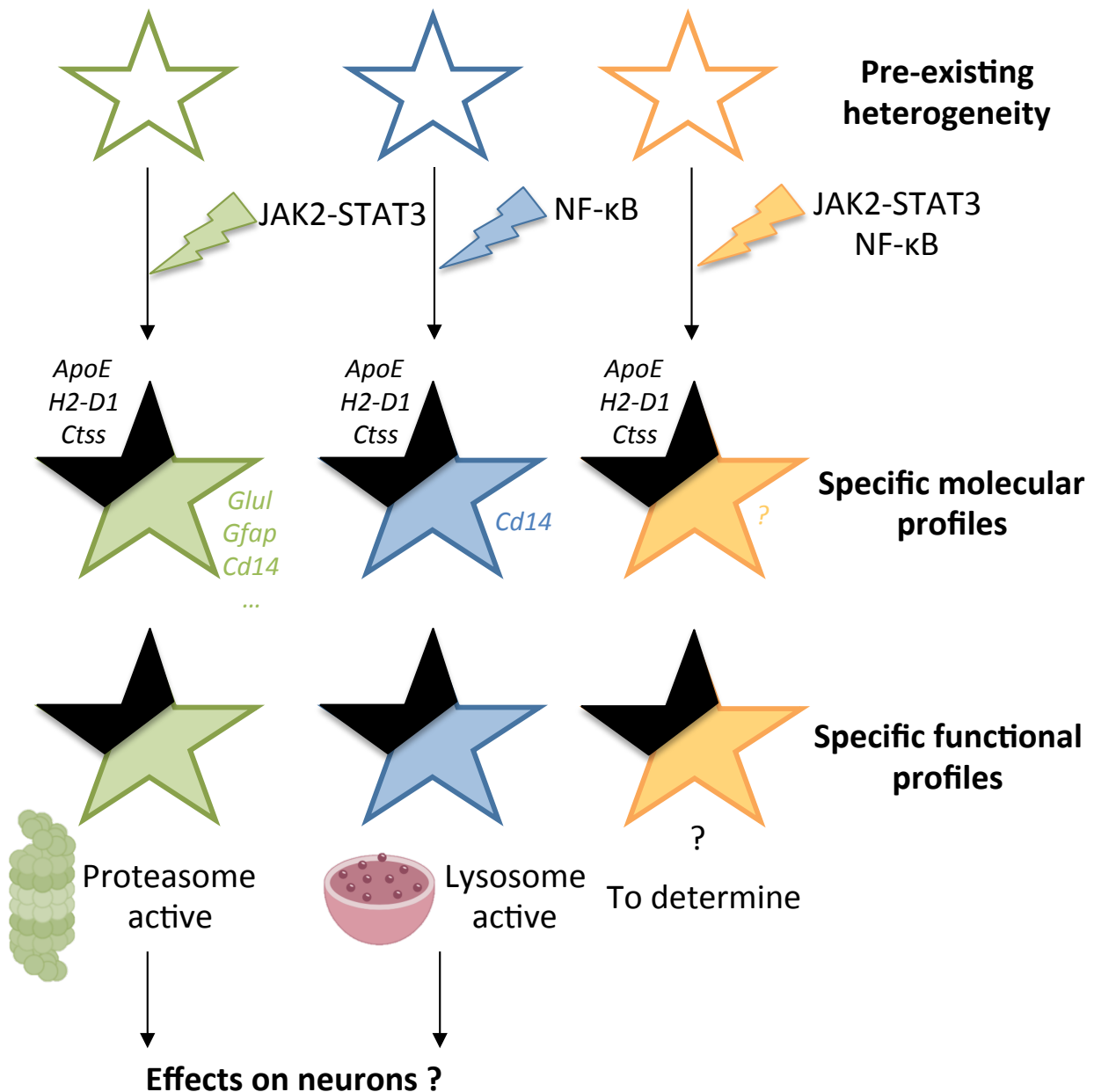


Figure 40. Modèle de l'induction de la réactivité astrocytaire par les voies STAT3 et NF-κB dans le PFC de souris APP. Différentes classes d'astrocytes semblent co-exister en conditions basales (astrocytes= étoiles). L'activation des voies STAT3 ou NF-κB ou les deux induirait à la fois des changements communs dans les astrocytes réactifs (noirs) et des changements moléculaires spécifiques à chaque classe (couleur). Les astrocytes réactifs de chaque classe seraient donc caractérisés par une signature moléculaire propre qui contrôle l'acquisition de fonctions spécifiques à chaque classe dont certaines seraient bénéfiques ou délétères pour les neurones.

Conclusion générale

Les astrocytes réactifs sont des cellules gliales essentielles au bon fonctionnement du SNC. En conditions physiologiques, les astrocytes opèrent une communication bidirectionnelle avec les neurones pour réguler un grand nombre de fonctions comme la transmission et la plasticité synaptique. Les astrocytes ont longtemps été considérés comme une population homogène mais les études récentes suggèrent que ces cellules ont des propriétés morphologiques, physiologiques et moléculaires diverses qui expliqueraient une telle variété de fonctions. En conditions pathologiques, les astrocytes deviennent réactifs mais cette réponse est aussi loin d'être stéréotypée. Bien que les astrocytes réactifs soient associés à des changements communs de type hypertrophie et augmentation de l'expression des protéines des filaments intermédiaires, la réactivité entraîne aussi des changements moléculaires et fonctionnels spécifiques, d'où l'émergence du concept de différents types d'astrocytes réactifs. Ce concept a révolutionné la manière de percevoir ces cellules comme de simples cellules support impliquées dans une réaction de type ON/OFF au cours des maladies. Au contraire, la réactivité est un phénomène complexe et l'implication des astrocytes réactifs dans la MA reste mal comprise.

Afin de comprendre leur rôle dans la MA, il est essentiel d'identifier les voies de signalisation impliquées dans ce processus pour manipuler et favoriser les voies qui seraient impliquées dans des fonctions bénéfiques des astrocytes réactifs et au contraire, inhiber celles qui seraient impliquées dans des fonctions délétères.

Dans la première partie de ce projet, nous avons focalisé notre attention sur la voie JAK2-STAT3, centrale dans la réactivité astrocytaire dans plusieurs maladies, modèles et régions. En modulant cette voie à l'aide de vecteurs viraux, nous avons montré que son activation était nécessaire et suffisante pour induire de nombreuses caractéristiques de la réactivité dans deux modèles murins de la MA : les souris APP/PS1dE9 et les souris 3xTg-AD. L'inhibition de la réactivité dans ces deux modèles révèle des effets variés dépendants du contexte pathologique.

A l'image des travaux récents sur l'hétérogénéité des astrocytes réactifs, différentes classes d'astrocytes réactifs pourraient donc exister entre ces deux modèles. Mais comment ces classes d'astrocytes réactifs sont générées ?

Nous proposons que la voie de signalisation JAK2-STAT3 agit comme un master régulateur à des étapes précoces de la réactivité mais que d'autres voies pourraient moduler/affiner la réactivité astrocytaire. Les différentes classes d'astrocytes réactifs seraient alors modulées par des cascades de signalisation distinctes conditionnant l'acquisition d'un profil moléculaire unique contrôlant des fonctions spécifiques à chaque classe.

Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons développé une stratégie basée sur l'utilisation de rapporteurs des voies de signalisation STAT3 et NF- κ B couplés à des protéines fluorescentes. De manière intéressante, nous avons montré que l'activation de ces voies de signalisation est hétérogène dans les astrocytes réactifs du cortex préfrontal de souris APP/PS1dE9. Les différentes classes d'astrocytes réactifs générées par l'activation de ces voies présentent des profils moléculaires spécifiques ainsi qu'une utilisation différentielle des systèmes de protéostasie.

A court terme, nous validerons la signature moléculaire des classes de signalisation d'astrocytes réactifs par des méthodes alternatives comme l'histologie, l'ISH et autant que possible des essais fonctionnels *in situ* afin de mieux caractériser ces classes.

A long terme, ce projet a pour ambition d'identifier les voies de signalisation qui contrôlent des classes d'astrocytes réactifs bénéfiques et délétères dans la MA. La versatilité de nos outils rapporteurs permettra en effet d'étudier de voies de signalisation supplémentaires impliquées dans la réactivité astrocytaire pour déterminer l'impact fonctionnel de chacune. Plus généralement, l'identification de classes d'astrocytes réactifs délétères ou dysfonctionnelles permettra de développer des approches plus ciblées de blocage de la voie de signalisation associée aux astrocytes réactifs délétères sans affecter les autres classes potentiellement bénéfiques par exemple. Ce type de stratégie ciblée aura probablement un meilleur impact thérapeutique sur les déficits de la MA par rapport à une approche d'inhibition indiscriminée de toutes les classes d'astrocytes réactifs.

Dans l'ensemble, une meilleure compréhension des classes d'astrocytes réactifs et de leurs signalisations associées permettront de mieux cibler et orienter le potentiel thérapeutique des astrocytes réactifs dans la MA.

Annexes

REVIEW ARTICLE

Questions and (some) answers on reactive astrocytes

Carole Escartin^{1,2}  | Océane Guillemaud^{1,2} | Maria-Angeles Carrillo-de Sauvage^{1,2} 

¹Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Département de la Recherche Fondamentale, Institut de Biologie François Jacob, MIRCen, Fontenay-aux-Roses, France

²Centre National de la Recherche Scientifique, Univ. Paris Sud, Univ. Paris-Saclay, UMR 9199, Neurodegenerative Disease Laboratory, Fontenay-aux-Roses, France

Correspondence

Carole Escartin, UMR 9199 (CNRS, CEA, Univ. Paris Sud) MIRCen, 18, route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-roses Cedex, France.
Email: carole.escartin@cea.fr

Funding information

Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Numbers: 2010-JCJC-1402-1, 2011-BSV4-021-03, ANR-16-TERC-00; Association Huntington France; Centre National de la Recherche Scientifique; Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives; Fondation pour la Recherche sur le Cerveau; Fondation Vaincre Alzheimer/LECMA, Grant/Award Number: FR-15015

Abstract

Astrocytes are key cellular partners for neurons in the central nervous system. Astrocytes react to virtually all types of pathological alterations in brain homeostasis by significant morphological and molecular changes. This response was classically viewed as stereotypical and is called astrogliosis or astrocyte reactivity. It was long considered as a nonspecific, secondary reaction to pathological conditions, offering no clues on disease-causing mechanisms and with little therapeutic value. However, many studies over the last 30 years have underlined the crucial and active roles played by astrocytes in physiology, ranging from metabolic support, synapse maturation, and pruning to fine regulation of synaptic transmission. This prompted researchers to explore how these new astrocyte functions were changed in disease, and they reported alterations in many of them (sometimes beneficial, mostly deleterious). More recently, cell-specific transcriptomics revealed that astrocytes undergo massive changes in gene expression when they become reactive. This observation further stressed that reactive astrocytes may be very different from normal, nonreactive astrocytes and could influence disease outcomes. To make the picture even more complex, both normal and reactive astrocytes were shown to be molecularly and functionally heterogeneous. Very little is known about the specific roles that each subtype of reactive astrocytes may play in different disease contexts. In this review, we have interrogated researchers in the field to identify and discuss points of consensus and controversies about reactive astrocytes, starting with their very name. We then present the emerging knowledge on these cells and future challenges in this field.

KEYWORDS

astrogliosis, brain diseases, neuron–glia interactions, reactive astrocytes

1 | INTRODUCTION

Astrocytes have key functions in the brain (Verkhratsky & Nedergaard, 2018). New discoveries are made regularly on their active roles in ion homeostasis, vascular coupling, synaptic plasticity, circuit building, synapse turnover, waste clearance or higher functions like sleep–wake cycle, food intake or memory (Verkhratsky & Nedergaard, 2018). One peculiar feature of these glial cells, first observed by 19th century anatomopathologists, is that they look different in the diseased brain [Figure 1, (Chaslin, 1891; Ramon y Cajal, 1925)]. The original observations reported morphological and histological changes, with increased

fibrillary structures and more visible cellular elements in scarring brain tissue from patients [Figure 1, see also (Liddelow & Barres, 2017)]. Such changes in astrocyte appearance are observed in the brain of patients suffering from a broad range of brain pathologies (e.g., epilepsy, neurodegenerative disease, brain cancer, ischemia, infection, axotomy, invasive injury, and toxin exposure), as well as in animal models thereof (Figure 2, and references in legend). *Astrocyte reactivity*, *Astrogliosis*, *Astrocyte activation*, *Reactive gliosis*, or *Astrocytosis* are among the terms used to describe such molecular, morphological, and functional changes in astrocytes. Even if definitions of astrocyte reactivity were proposed by Prof. M. Sofroniew (Sofroniew, 2009, 2014a; Sofroniew & Vinters,

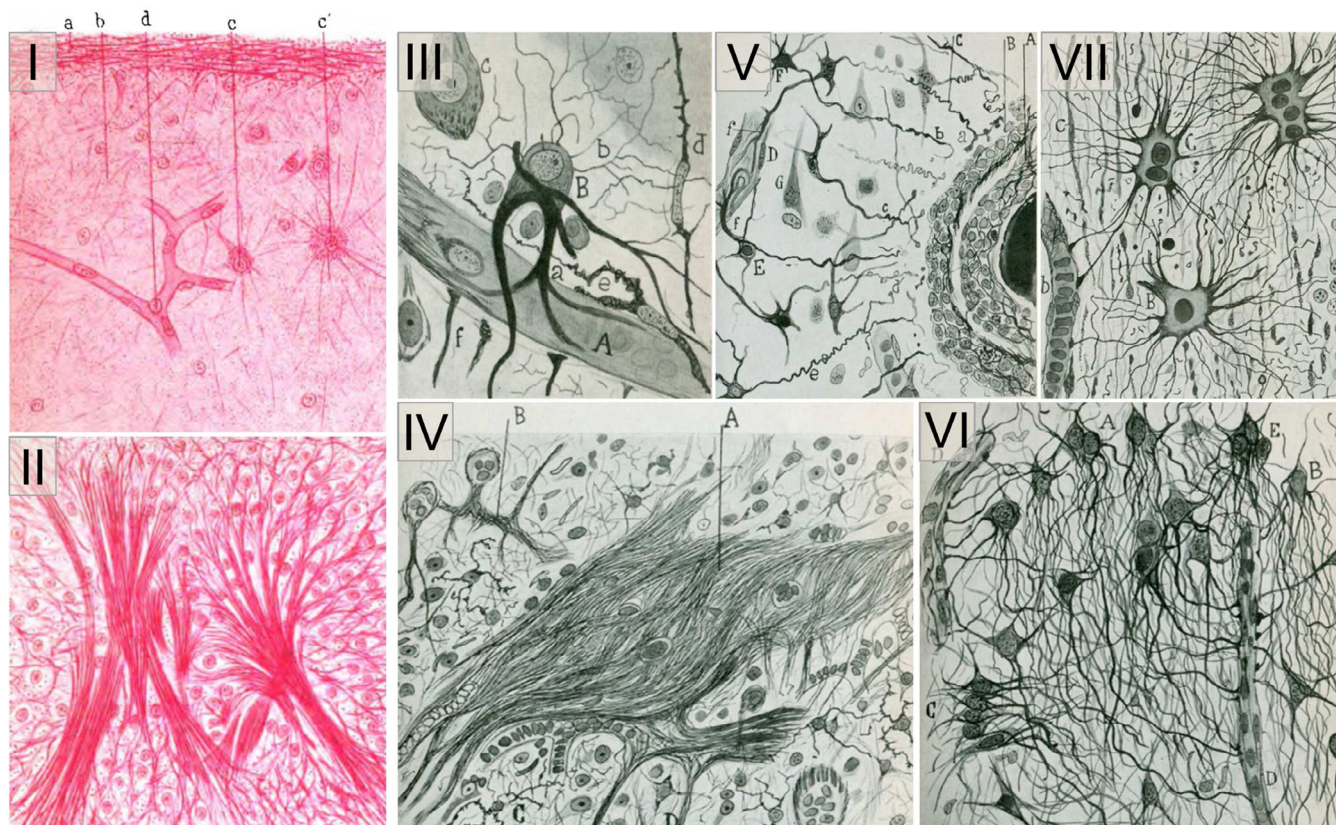


FIGURE 1 Original drawings of reactive astrocytes in Humans. I, II Chaslin's drawings of sclerotic cortical brain sections from an adult epileptic patient, impregnated by the picro-carmin method (Chaslin, 1891). I, This drawing represents a non-lesioned region. A blood vessel (d) connected by a star-shaped astrocyte (c) is observed, as well as few small nuclei. II, The drawing of a lesioned tissue shows an accumulation of large bundles of fibers and many nuclei, characterized by Chaslin as "gliotic tissue." III–VII, Ramon y Cajal's drawings of cortical (III–VI) and cerebellar (VII) brain sections from an adult patient suffering from general progressive paralysis, after silver impregnation (Ramón y Cajal, 1925). III, A reactive astrocyte with thick branches polarizing toward a blood vessel (a). Thin processes emerge from the other side of the cell body (b). Microglia cells (e, d) and one neuron (c) are also visible. IV, Large bundles of fibers named "Weigert fibers" (A), emanating from glial cells, which are barely visible. Note the similitude with Chaslin's drawing (II). C, Microglia. V, Reactive astrocytes with twisted processes (a–d) surrounding an infiltration nodule (A). Degenerating neurons with protein aggregates in their cell bodies are visible (G). D, Blood vessels; f: astrocyte endfeet. VI, Reactive astrocytes with numerous polarized processes have lost their individual, nonoverlapping domains. Astrocyte cell bodies are sometimes in direct contact, suggesting "proliferative astrocyte centers" (A, C, E), as proposed by Ramon y Cajal. D: Blood vessels. VII, Hypertrophic cerebellar astrocytes (B, C, D). Two of them (C, D) have multinuclear cell bodies, suggesting ongoing cell division. b: Blood vessel

2010) and others (Pekny et al., 2016), a review of the literature shows that the use and meaning of these different terms are quite broad and inconsistent. Indeed, we surveyed ~40 researchers in the field (see complete list in Supplemental Table 1), and found that they have quite different visions of what reactive astrocytes are, or are not (Table 1) and they do not agree on the nomenclature (Table 2).

Beyond the discrepant terminology, some common features of reactive astrocytes emerge from this survey. A broad definition could be summarized as "astrocytes sense and respond to an abnormal situation in the brain. They change at the morphological, biochemical, transcriptional, and functional levels. These changes are maintained while the pathological stimulus is present but some aspects may resolve. Reactive astrocytes are heterogeneous and may have various effects on disease progression." Indeed, reactive astrocyte heterogeneity is underlined by most researchers and contested by none of them (Table 1). This opens new areas of research to understand its origin and consequences (Section 5).

Other points that remain controversial will be covered later in this review: Are glial fibrillary acid protein (GFAP) and morphological changes appropriate markers of reactive astrocytes (Section 4)? Can we identify better markers (Section 6)? Do reactive astrocytes do good or bad things in disease (Section 8)? Do they die (Section 9)? Should aging astrocytes be considered as reactive (Section 12)? Other points were not necessarily raised by surveyed researchers, but are still actively studied: What are the exact triggers and downstream signaling pathways controlling this response (Section 7)? Where do reactive astrocytes come from and what do they become (Section 10)? How do reactive astrocytes interact with other cell types involved in innate and adaptive immunity (Section 11)? Addressing all these questions will help provide a refined vision of this complex brain response.

The aim of this review is not to provide an extensive overview of the now abundant literature on reactive astrocytes, but instead, discuss emerging research questions and unresolved issues on this topic.

2 | HOW TO BEST NAME THEM?

But first, it is important to name our research subject and define what we are talking about. Our survey of researchers in the field of astrocytes showed that even three broadly used terms had different inferred meanings (Table 2). Many surveyed principal investigators (PI) agreed that the very definition of astrocyte reactivity was ambiguous and that a clear nomenclature would benefit the field.

The heterogeneity of this response and the variety of “reactive states” (see Section 5), call for a broad and inclusive definition that can

further be refined in each context. Indeed, all recognized that drastic changes happen to astrocytes in pathological conditions, with some core and some disease-specific alterations (Table 1, Supplemental Text). We thus need words to describe this phenomenon. What are the most appropriate ones? There was some agreement that *astrocyte activation* is misleading because it can apply to physiological activation like transient Ca^{2+} signaling in response to normal neuronal activity (see Section 4-Timescale). It is thus better to avoid this term. Another point of partial convergence was that *astrogliosis* implied something different (e.g., stronger or irreversible; with scarring, proliferation or immune

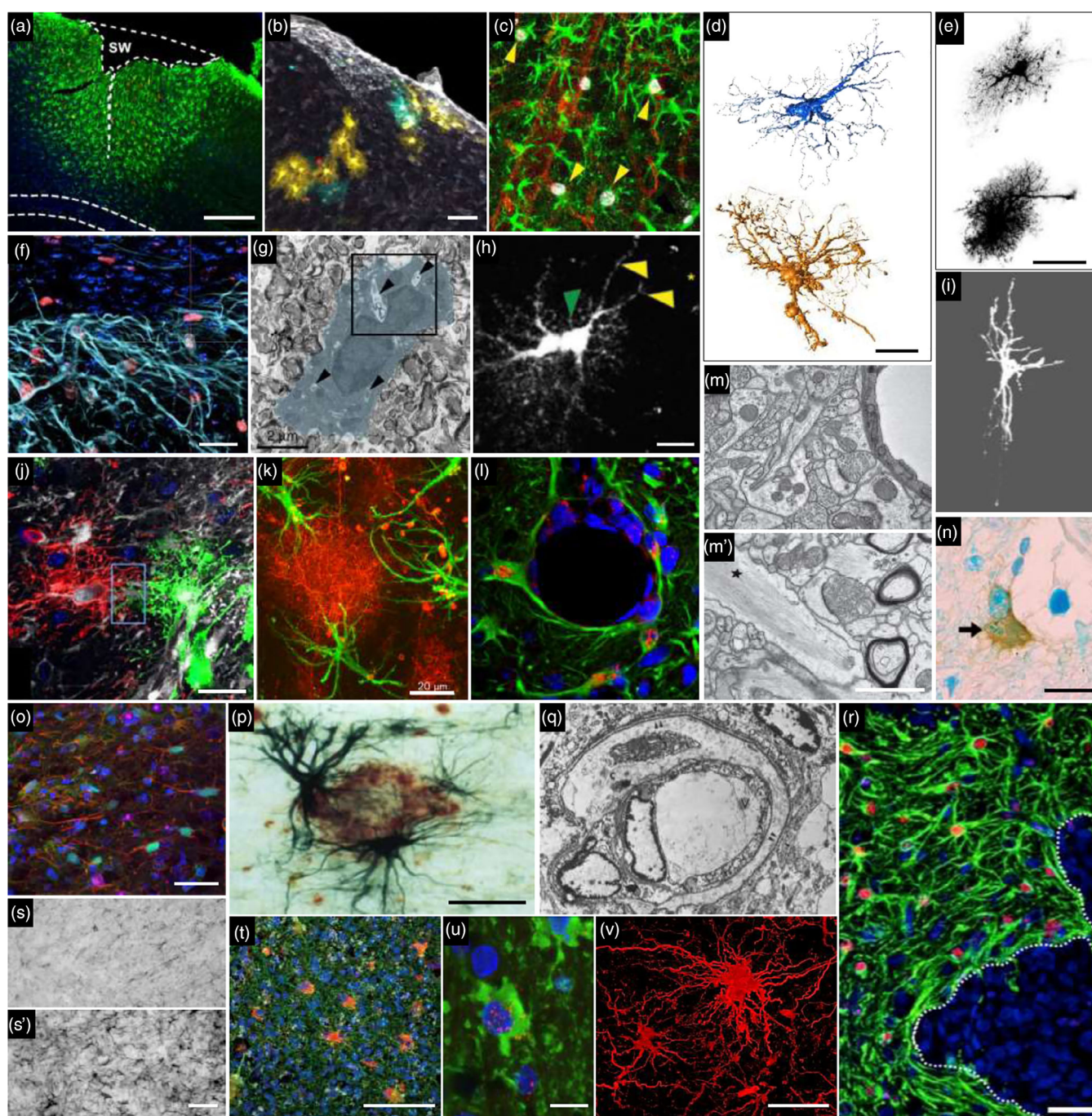


FIGURE 2 Legend on next page

infiltration), which definitely does not apply to all disease conditions (Table 2). We are therefore left with the term *astrocyte reactivity*. The problem with this expression, as stressed by several PIs, is that it implies an “ability” to become (see Table 1). As discussed by Dr. A. Serrano-Pozo, *reaction* would be more correct to define the final state of astrocytes (see Supplemental Text). We thus propose to avoid the use of *astrocyte activation* and *astrogliosis* and instead use *reactive astrocytes* or *astrocyte reaction* and add to *stroke/epilepsy/Alzheimer disease* (AD) to further define it. Expressions like *scar-forming astrocytes*, *proliferating reactive astrocytes*, and *phospho-STAT3⁺ reactive astrocytes* are also very useful to functionally or molecularly define these cells (see details in Section 5). We will use this nomenclature in our review, but a more widespread agreement on terminology would be beneficial to the astrocyte community.

3 | WHY BOTHER WITH REACTIVE ASTROCYTES?

There are more than 17,500 articles recovered in PubMed with the query “Reactive astrocyte” OR “Astrocyte reactivity” OR “Astrogliosis,”

with more than 400 articles published each year since 2000. Why does such a broad and somehow ill-defined concept trigger this significant interest? Indeed, if astrocytes become reactive in response to something already going wrong, why should we care? It may already be too late; the initial pathological event may have started well before and triggered an irreversible disease cascade.

It is striking that astrocyte reaction is such a widespread response, reported in virtually all brain diseases, brain regions, and multiple species including invertebrates, like *Drosophila*, many mammals, and Humans [(Kremer, Jung, Batelli, Rubin, & Gaul, 2017; Sofroniew & Vinters, 2010), see Figure 2]. It is thus very important to better understand what it means for an astrocyte to engage in this phenotype switch and how it can influence surrounding cells.

Astrocyte reaction is by definition a secondary event; yet, it may still impact disease progression, which lasts for months or years in the case of tumor, neurodegenerative disease, or epilepsy. More importantly, astrocytes are reactive at the clinically visible stages of the disease, when patients seek diagnosis and treatment. Turning reactive astrocytes into beneficial partners for vulnerable neurons exposed to a chronic disease or to the long-term consequences of an acute injury would be a valuable therapeutic strategy.

FIGURE 2 Astrocytes become reactive in a variety of pathological conditions and species. Different methods are used to evidence astrocyte reaction to different diseases, in different species and brain regions, showing the universality of this response but also some context-specific changes. (a) Frontal cortex mouse brain section following stab wound injury (SWI). A gradient of reactive astrocytes (GFAP⁺, green) is visible around the injury site. Scale bar: 500 μ m (Frik et al., 2018). (b) Reactive astrocytes in the cortex of a mouse experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model. Reactive astrocytes are labeled with StarTrack multicolor lineage tracing system to identify developmental clones by their pattern of fluorescent protein expression. Scale bar: 80 μ m (Bribian, Perez-Cerda, Matute, & Lopez-Mascaraque, 2018). (c) Immunofluorescence for glial fibrillary acid protein (GFAP) and S100 β (green), Ki67 (white), and CD31 (blood vessels, red) in the mouse cortex, 5 days after middle cerebral artery occlusion (MCAO). Several reactive astrocytes are proliferating (Ki67⁺) in the ischemic penumbra (yellow arrowheads) (Frik et al., 2018). (d) 3D rendering of the morphology of a normal (blue) and a hypertrophic ciliary neurotrophic factor (CNTF)-induced reactive astrocyte (brown) in the mouse striatum. Scale bar: 50 μ m (Ligneul et al., 2019). (e) A nonreactive (up) and reactive (down) astrocyte in the mouse cortex, 4 days after cortical lesion. Dye filling reveals the astrocyte ramified morphology and process enlargement in reactive astrocytes. Scale bar: 25 μ m (Wilhelmsson et al., 2006). (f) Immunofluorescence for GFAP (cyan) and BrdU (red) in the mouse spinal cord after SCI. The border of the lesion core (upper part) presents a high proportion of BrdU⁺/GFAP⁺ proliferative reactive astrocytes forming the glial scar. Scale bar: 25 μ m (Wanner et al., 2013). (g) Immunoelectron micrograph of a phagocytic reactive astrocyte in the mouse striatum 3 days after MCAO. GFAP staining is outlined in blue. Phagocytic inclusions (arrowheads) are visible. Scale bar: 2 μ m (Morizawa et al., 2017). (h) Two-photon microscopy of GLAST-eGFP mouse cortex, 28 days after SWI. A GFP⁺ astrocyte undergoes cell division (green arrowheads), while some of its processes (yellow arrows) polarize toward the lesion (yellow star). Scale bar: 20 μ m (Bardhele et al., 2013). (i) A dextran-filled astrocyte in a rat transected optic nerve. This reactive astrocyte displays increased caliber of individual fibers and loss of global complexity. Scale bar: 30 μ m (Butt & Colquhoun, 1996). (j) Image of two adjacent GFP⁺ astrocytes (white) labeled with Dil (green) and DiD (red) in the mouse cortex, 1 week after iron injection to induce epilepsy. Their processes overlap more (box), showing partial loss of domain organization. Scale bar: 20 μ m (Oberheim et al., 2008). (k) Reactive astrocytes around an amyloid plaque in the hippocampus of 3xTg-AD mice (GFAP in green and A β in red). Scale bar: 20 μ m (Olabarria, Noristani, Verkhratsky, & Rodriguez, 2010). (l) Reactive astrocytes (GFAP, green), around a vessel overexpress the chemokine CCL2 (red) in a mouse model of prion disease (ME7), 2 hr after TNF α injection in the hippocampus (Hennessy, Griffin, & Cunningham, 2015). (m, m'), Electron micrographs of a CNTF-induced reactive (m') and a control (m) rat astrocyte. The reactive astrocyte displays an enlarged process filled with bundles of filaments (black star). Scale bar: 1 μ m (Escartin et al., 2006). (n) A human perivascular reactive astrocyte (GFAP, brown) close to a leukoencephalopathy lesion contains phagocytosed LFB⁺ myelin debris (blue, arrow). Scale bar: 25 μ m (Ponath et al., 2017). (o) Triple immunofluorescence for STAT3 (green), GFAP (red), and Huntingtin aggregates (magenta) in the putamen of a macaque lentiviral model of Huntington disease (HD). Reactive astrocytes display STAT3 nuclear labeling. Scale bar: 40 μ m (Ben Haim et al., 2015). (p) Reactive astrocytes around an amyloid plaque in the hippocampus of an Alzheimer disease (AD) patient, visualized by GFAP (black) and A β (brown) immunohistochemistry. Note similarity with image in (k). Scale bar: 50 μ m (Pike, Cummings, & Cotman, 1995). (q) Electron micrograph showing an enlarged perivascular reactive astrocyte endfoot enclosing a cortical vessel (v) in the brain of an AD patient. $\times 7,000$ (Wegiel & Wisniewski, 1994). (r) Human cortical reactive astrocytes labeled for GFAP (green) and phospho-STAT3 (red) around brain metastases from lung cancer (dotted lines). Scale bar: 35 μ m (Priego et al., 2018). (s-s') GFAP immunohistochemistry on *substantia nigra pars compacta* sections from a control and a parkinsonian macaque treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) (Barcia et al., 2011). (t) Reactive astrocytes in acute lesions of a multiple sclerosis (MS) patient. Triple immunofluorescent staining of reactive astrocytes with GFAP (green), Complement 3 (C3, red), and activated microglia/macrophages with CD68 (white). Scale bar: 100 μ m (Liddel et al., 2017). (u) Immunofluorescence staining for S100 β (green) and in situ hybridization for C3 (red) in an ALS patient. Scale bar: 10 μ m (Liddel et al., 2017). (v) 3D rendering of a reactive astrocyte stained with vimentin around human glioblastoma. Scale bar: 35 μ m (Barcia Sr. et al., 2013).

TABLE 1 Reactive astrocytes: Definitions, consensus, and controversies

Feature/concept	Agree	Agree and refine	Disagree
What is it?			
A phenotypic change, alteration	AA AM ASP AP AVo CC CS EG FP GC HK HS LP MF MS NA PH SHRO SL SR VG	GeP: short-term changes also (Ca^{2+} , Glu/GABA/ K^+ buffering, coupling.) KM: dynamic state IW: changes of viable, not wounded/dying astrocytes	
A response	AL AM ASP EG FP GC HS IW JOC MF MG MS NA SL SHRO SO SS VG		
A reprogramming, transformation, conversion	AVe KM	ASP: genes & functions down-regulated as well AVo: go back to more immature/plastic state DB: may come from latent progenitors SK: become a different type of cells	
An ability, propensity	SS ASP SO	CC: they are now more reactive to a future stimulation LP: capacity to become	
What does it change in astrocytes?			
Molecular (mRNA & proteins), morphological, functional changes	AA AM AVo ASP CS EG FP GC HK HS JOC LB MS NA SK SR SS VG	AP: reactive astrocytes integrate & regulate information differently CN: initial response biochemical, then transcriptional SHRO: biochemical as well GaP IW KM: Activation of specific signaling pathways	
Both gain & loss of functions	ASP CN MS	GC: importance of Ca^{2+} signaling HS: global loss of proteins involved in ion/neurotransmitter homeostasis & change in extracellular matrix production SHRO: gain/loss of function can occur without reactive phenotype	
Proliferation not prevalent	ASP KM LP	EG: may refer to GFAP ⁺ NSC converting into astrocytes MS: newborn astrocytes form scars	
What induces it?			
Non-physiological conditions (injury, disease, stress, environment alterations)	ASP CN CS EG FP GC JOC HK HS IW MS NA SL SO SR VG	AL GeP MF SHRO: not exclusively pathological stimulus AM: exclude any physiological changes	
External/environmental stimulus or signal	AL ASP GaP MF SHRO	JOC: in response to glia injury as well = internal signal	
Aging also	ASP SR		CS: Aging is not necessarily pathological 
Is it a homogeneous response?			
Heterogeneous:	AL AM ASP AVe AVo CC CJL CS CN DB DR EG GaP GC HK JOC KM LB MF MG MS NA PH RS SL SS		

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Feature/concept	Agree	Agree and refine	Disagree	
- continuum	<i>GaP MF PH</i>	<i>AVe MS SS</i> : tuned to the nature & strength of the insult <i>AVe CS DB</i> : more than A1/A2 <i>CS</i> : worsens with disease progression <i>DB</i> : worsens with age	<i>AVo AM GL MG SL</i> : Discrete states/phenotypes rather than continuum	
- dictated by type of insult/disease ...	<i>AM ASP EG GC HK MF MG NA SL</i>			
... and by previous heterogeneity, brain regions, age	<i>AVe AVo CS CN KM SS</i>	<i>DB MS</i> : also by signaling		
<i>GFAP & morphological changes are core hallmarks/defining features</i>	<i>AA DR EG GeP JOC KM MF NA PH RS</i>	<i>LP</i> : also associated with increased cytokines	<i>ASP</i> : Morphological changes not systematic <i>AVo</i> : Hypertrophy may be an artifact of increased GFAP staining <i>AVe GL RS</i> : Misleading <i>CJL</i> : GABA/proBDNF-based classification instead <i>GC</i> : Characterize only astrogliosis	
What are the consequences?				
<i>Can have good or bad effects</i>	<i>DR GC LP MS SK</i>	<i>EG</i> : adaptive response in acute injury to recover homeostasis by sealing off injured tissue. In chronic injury, maladaptive with dysfunctional astrocytes <i>GaP</i> : not only secondary, also key contributor	<i>AVe</i> : Always good, evolutionary driven. Even neurotoxic astrocytes may have defensive roles <i>AVe HS IW SO</i> : Objective = restore homeostasis <i>IW</i> : Form a scar to limit lesion expansion <i>CS</i> : Reactive astrocytes are pathologically altered <i>CJL</i> : Always bad in ND through GABA/H ₂ O ₂ release	
<i>Reversible & transient</i>	<i>CN GC MS SO</i>	<i>GeP SS</i> : astrogliosis is not		

Glu, glutamate; ND, neurodegenerative diseases; NSC, neural stem cells.

In December 2018 and January 2019, we surveyed 61 researchers actively working in the field of (reactive) astrocytes with different approaches, on different diseases and models or in physiology. We asked them the following two questions:

1—What is your definition of astrocyte reactivity, in a few sentences? (Responses listed in Table 1).

2—Do you consider "astrogliosis," "astrocyte activation," and "astrocyte reactivity" as synonymous terms? (Responses listed in Table 2).

We collected 38 replies (see Supplemental Text for full replies) from junior and more senior researchers, from both genders and 12 countries (see list in Supplemental Table 1). It is not a perfect or unbiased sampling of the community, but it represents the first attempt to survey different researchers working and publishing on astrocytes. It shows that some points are consensual while others are more controversial.

Replies were analyzed and grouped under different features or concepts (first column), addressing different questions listed in boldface above.

Respondents, identified by their initials, either agreed to these definitions (second column), agreed and provided further explanations (third column) or disagreed (fourth column). Pie charts represent the percentages of responses (green = agree; red = disagree; gray = not mentioned) for features mentioned by more than 18 respondents or for controversial features.

The definitions given in response to question 1 are linked to the nomenclature discussed in response to question 2, since several researchers provide specific definitions for each term. For the sake of simplicity, we considered that responses to question 1 may apply to any of the three terms (astrogliosis, astrocyte activation, and astrocyte reactivity). Responses to question 2 help better pin down further differences linked to terminology.

TABLE 2 Nomenclature (*astrogliosis, astrocyte activation, astrocyte reactivity*)

	Agree	Agree & Refine	Disagree	
These three terms are ill-defined...	AM CC CS DB DR FP MG PH SO	EG RS: meaningless terms	MS: Still valid	
...need new terminology or at least precise definition	ASP AVe AVo CJL DB GaP LB MG	EG: based on molecular & functional profiles	SL: Better not add new names	
Use a simple, broad, inclusive, collective definition	MF MG MS SR	AL CC DB: but then need to precise categories/functions/specification GaP: umbrella definition		
These three terms have different meanings ... refer to different grades/stages	ASP AVo CC CN GC GaP LB MG PH SS	CJL: GABA/proBDNF based classification for hippocampal/cortical astrocytes.* CN: reactivity = biochemical response, maintained as activation (transcriptional) GaP MG SS: increase severity: activation < reactivity < astrogliosis GeP: activation = response to normal neuronal activity, reactivity = response to abnormal neuronal activity LB: Astrocyte activation = functional/phenotypic changes. Astrocyte reactivity = morphological changes LP VG: Activation = transition to reactivity	AVe DB HK IW JOC RS SL: All 3 equivalent AVe: Also "Astrocytosis"	
Astrocyte activation refers to physiology and should not be used for pathology	AA AM CS EG FP GC HS NA SR SS	Not appropriate, because: ASP: suggests independent of a trigger. May involve loss of function KM: better suited for microglia MS SL: suggests inactive otherwise	AL AP DR MF SK SO: Activation = reactivity AL: Both involve response to stimulus (either physiological or pathological)	
Astrogliosis is different: - involves proliferation or increased numbers - involves scar - involves inflammation (=immune cell recruitment) - involves hypertrophy - ultimate stage	FP AL ASP CC CN LP LB MF SK VG GaP KM SO AL MG LB AL AP	ASP: astrogliosis should be abandoned [–osis = pathological state, proliferation/increased number or invasion/infiltration/spreading] CC: property of a population DR: clinical term = injury AP: increase in 3D domain GC: with GFAP expression GeP SS: Irreversible	AA CS EG HS MS NA SR: Astrogliosis = reactivity	

*see Supplemental Text.

In addition, as astrocytes react to altered homeostasis in the brain, they are endogenous biomarkers for brain diseases. Development of non-invasive imaging techniques, like magnetic resonance imaging (MRI) or positron emission tomography (PET) to visualize when and where astrocytes become reactive would help disease diagnostic. Available imaging methods are not quite specific for reactive astrocytes, they rather detect neuroinflammation as a whole (i.e., reactive glial cells, sometimes infiltration of peripheral immune cells) or associated changes, for example, in brain metabolism (Aiello et al., 2018; Carrillo-de Sauvage et al., 2015; Lavis et al., 2012). Indeed, astrocytes may significantly contribute to imaging signals,

such as those measured with blood oxygenation level-dependent functional MRI or [^{18}F]-fluorodeoxyglucose uptake by PET, and therefore their reactive state may impact these measurements (Carter et al., 2019; Mishra, 2017). Refined approaches that are more selective for reactive astrocytes are being developed (Carter et al., 2019; Ligneul et al., 2019; Rodríguez-Vieitez et al., 2016; Scholl et al., 2015). Such improvements will be facilitated by basic studies that establish the molecular and functional profile of reactive astrocytes (see Section 6) but also of their microglia or neuronal neighbors, allowing the identification of new and specific astrocyte targets.

Last, some astrocyte proteins like GFAP or their break-down products may also end up in the cerebrospinal fluid of patients subject to traumatic brain injury [TBI, (Halford et al., 2017)], but also in more progressive diseases like Creutzfeldt-Jakob disease or AD [for review, see (Carter et al., 2019; Perez-Nievas & Serrano-Pozo, 2018)].

Therefore, defining how astrocytes change during disease may *in fine* lead to new biomarkers, better diagnosis tools, and even original therapeutic strategies, which are long-sought goals for many diseases.

4 | WHAT ARE THE DEFINING FEATURES OF REACTIVE ASTROCYTES?

Several common features are observed in very different cases of brain injuries and diseases. They can be used to define the core hallmarks of reactive astrocytes.

4.1 | Morphological changes

In pathological conditions, astrocytes display morphological changes, including hypertrophy of soma and main processes, but not only (see Figure 2). This was already noted by earlier pathologists using impregnation techniques to achieve sparse labeling of astrocytes (Figure 1). Diolistic labeling, dye filling, or expression of a cytosolic or membrane-tagged fluorescent protein reveal the complex and highly ramified astrocyte morphology. These methods evidence subtle alterations in astrocyte morphology that could be missed by cytoskeleton labeling with GFAP antibodies (See Figure 2b,d,e,h,i,j). They show process polarization toward a lesion [(Bardehle et al., 2013), Figure 2h] or ramification changes while the overall 3D domain covered by a single astrocyte is not massively disrupted [(Wilhelmsson et al., 2006), Figure 2e]. In more severe diseases like epilepsy, astrocytes may also retract their fine peripheral processes, become asymmetric and overlap more with their neighbors [(Oberheim et al., 2008; Sun & Jakobs, 2012), Figure 2j]. An extreme case is the glial scar caused by mechanical lesions of brain or spinal parenchyma (Figure 2f), or severe focal lesions like tumors (Figure 2r). Astrocytes become elongated and assemble to form a compact and permanent scar. Other cell types, such as fibroblasts, oligodendrocyte progenitor cells (OPC), ependymal cells, or pericytes, may also contribute to this scar (Adams & Gallo, 2018; Sabelstrom, Stenudd, & Frisen, 2014). This question and the overall effect of the glial scar on axonal regrowth are still debated (Anderson et al., 2016; Silver, 2016). Readers are referred to excellent reviews on the topic (Adams & Gallo, 2018; Sofroniew, 2018).

4.2 | Molecular changes

A defining feature of reactive astrocytes is their overexpression of intermediate filament proteins like GFAP or vimentin. The “increased number and size of fibrils in neuroglia of sclerotic brain tissue in epileptic patients” was noted by anatomopathologists already at the end of the 19th century [see Figure 1, (Chaslin, 1891)]. Electron microscopy also evidences large bundles of filaments in reactive astrocytes

(Figure 2m'). In AD brains, GFAP accumulates to the extent that it forms protein aggregates resembling Rosenthal fibers in reactive astrocytes (Wegiel & Wisniewski, 1994). The surveyed researchers broadly acknowledged the validity of GFAP as a marker for reactive astrocytes (Table 1), but several of them also underlined its limits (see further discussion in Section 6).

Owing to refined methods to isolate astrocytes and investigate their transcriptome at the genome-wide level, recent studies revealed that astrocyte reaction involves massive transcriptional changes that go well beyond *Gfap* induction. Hundreds of genes are either up-regulated or down-regulated in astrocytes in AD models and patients (Ceyzeriat et al., 2018; Orre et al., 2014; Sekar et al., 2015), in a mouse model of hyperammonia (Lichter-Konecki, Mangin, Gordish-Dressman, Hoffman, & Gallo, 2008), or multiple sclerosis (MS) (Itoh et al., 2018), following spinal cord injury [SCI, (Anderson et al., 2016)], cortical stab wound injury [SWI, (Sirko et al., 2015)], middle cerebral artery occlusion (MCAO), or lipopolysaccharide (LPS) injection (Zamanian et al., 2012). Several genes induced in reactive astrocytes both in the LPS and MCAO models were identified. Among them, *Serpina3n* and *Lcn2* were further validated as strongly, but transiently induced following LPS injection or MCAO (Zamanian et al., 2012). They are also induced in other disease models (Itoh et al., 2018; Suk, 2016; Switonski, Szlachcic, Krzyzosiak, & Figiel, 2015). Change in transcriptome is a conserved feature of astrocyte reaction, similarly observed in *Drosophila* glia (Lu et al., 2017).

Interestingly, genes that are down regulated in reactive astrocytes may also hold the key to understanding the roles of these cells in disease. Some genes associated with important astrocyte functions like the potassium channel KIR4.1 [*Kcnj10*, (Nwaobi, Cuddapah, Patterson, Randolph, & Olsen, 2016)], the glutamate transporter GLT1 [*Slc1a2*], or glutamine synthase GS [*Glu1*, (Sheldon & Robinson, 2007)] are repeatedly reported as down regulated in disease. Likewise, reduced expression of several homeostatic astrocyte genes is reported in mouse models of SWI (Sirko et al., 2015) and TBI (Shandra et al., 2019) (see also Section 10), but there is no established list of genes down-regulated in reactive astrocytes across multiple diseases. Overall, the significant phenotypic alterations observed in reactive astrocytes involve large-scale transcriptome modifications and functional changes (see Section 8).

4.3 | Migration & proliferation

The very first observers of astrocytes noticed increased numbers of nuclei in sclerotic tissue of epileptic brains, and discussed the proliferative capacity of neuroglia [Figure 1, (Chaslin, 1891; Ramón y Cajal, 1925)]. But more recent studies based on two-photon imaging of astrocyte reaction, fate mapping and bromodeoxyuridine (BrdU) labeling in animal models, challenged this dogma [(Bardehle et al., 2013; Buffo et al., 2008), Figure 2c, h]. Immunostaining with Ki67 or Proliferating Cell Nuclear Antigen in patients confirmed that only a small percentage of reactive astrocytes undergoes proliferation (Perez-Nievas & Serrano-Pozo, 2018). These proliferative astrocytes appear to require a stimulus from outside the central nervous system (CNS):

TABLE 3 Astrocyte reaction is a heterogeneous response

Levels of observed heterogeneity	Disease modeled	Experimental model	CNS region	Species	Examples of heterogeneity	Additional levels of heterogeneity	Hypertrophy observed? Method used	GFAP observed? Method used	Others markers of reactive astro	References
Species	Neuroinfla.	Primary astro exposed to LPS, IL1, Poly IC		H, Ms	Only Ms astro are dependent on TLR4 or CD14. Ms & H reactive astro produce different cytokines	Signaling	n.m.	n.m. (↑ cytokine)		Tarassishin, Suh, and Lee (2014)
Gender	PD	MPTP [Mc], 6-OHDA [R]	Str	Mc, R	Mc: ↓ Cx30 IR; R: ↑ Cx30 IR		Visual	IHC/IF		Charron et al. (2014)
	Stroke	MCAO	Cx	Ms	↑ GFAP IR F > M		Visual	IHC/IF		Cordeau (2008)
	Trauma	SWI	Cx	Ms	Nbr Ccl2 ⁺ astro around lesion M > F		Visual	IHC/IF	Vimentin	Acaz-Fonseca, Duran, Carrero, Garcia-Segura, and Arevalo (2015)
Disease	AD, epilepsy	Tg2576, KA	Cx	Ms	Loss of astro domain organization in epilepsy but not in AD	Morphological	Diolistic labeling	IHC/IF		Oberheim et al. (2008)
	Trauma, stroke, AD	SWI, MCAO, APP/PS1	Cx	Ms	Shh promotes astro proliferation & stem cell potential in open lesion only (SWI & MCAO)	Signaling	Visual	IHC/IF		Sirko et al. (2013)
	Neuroinfla., stroke	LPS, MCAO	Cx	Ms	50% regulated genes are disease-specific	Molecular	Visual	IHC/IF	Serpina3n, Lcn2	Zamanian et al. (2012)
	Trauma, AD	SWI, APP23	Cx	Ms	Different GFAP mRNA ↑ (TBI: 82-fold, denervation: 30-fold, AD: 18-fold increase)		Visual	IHC/IF, qPCR		Burbach, Dehn, Del Turco, Staufenbiel, and Deller (2004)
Temporal	ALS	SOD1 ^{G93A}	SC	Ms	Presymptomatic stage: astro NF-KB activation delays disease progression. Symptomatic: accelerates disease progression		Visual	IHC/IF		Quali Alami et al. (2018)
	MS	EAE	Cx, Hip, Cb, SC	Ms	Early stage: ↑ MHC-II mRNA, =cholesterol synthesis pathway. Late stage: ↑ MHC-II mRNA, ↓ cholesterol synthesis pathway. Gene expression changes differ between the four regions	Regional, molecular	n.m.	qPCR		Itoh et al. (2018)

(Continues)



TABLE 3 (Continued)

Levels of observed heterogeneity	Disease modeled	Experimental model	CNS region	Species	Examples of heterogeneity	Additional levels of heterogeneity	Hypertrophy observed? Method used	GFAP observed? Method used	Others markers of reactive astro	References
Regional	AD	Astro cultures exposed to β APP	Cx, Hip, Ch, SC	R	Reaction induced only in Cx & hip		Visual	IHC/IF	CSPG	Hoke, Canning, Maledud, and Silver (1994)
Epilepsy		Pilocarpine	Hip, Cx	Ms	Different transcriptional changes between Hip & Cx astro	Disease stage, molecular	Visual	IHC/IF, qPCR		Clasadonte et al. (2016)
Topographical	AD	/	Cx	H	$\nearrow$ Cx43 IR around plaques		Visual	IHC/IF, EM		Nagy, Li, Hertzberg, and Marotta (1996)
AD	APP _{SWE} /PS1 _{ΔE9}		Cx	Ms	$\nearrow$ P2Y1R mediated Ca ²⁺ signaling in reactive astro near plaques	Signaling	Visual	IHC/IF		Delekate et al. (2014)
Trauma	SWI		Cx	Ms	Proliferation of juxta-vascular astro only	Functional	Visual	IHC/IF		Bardehle et al. (2013)
SCI, trauma	Laminectomy L1/L2, Cryo-injury		SC, Cx	Ms	Scar border: elongation & proliferation ($\nearrow$ radial glia markers). Distal: No proliferation & hypertrophy ($\nearrow$ GFAP)	Morphological, functional	Morphometry	IHC/IF		Wanner et al. (2013), Kim et al. (2012)
Trauma/excitotoxicity	SWI/KA			Ms	NFATc3 ⁺ astro are found only around lesions	Topographical	Visual	IHC/IF	NFATc3	Serrano-Pérez (2011)
Morphological	AD	3xTg-AD	Hip	Ms	Astro atrophy away from plaques ($\searrow$ GFAP surface & volume)	Topographical	Morphometry	IHC/IF		Olabarria et al. (2010)
Trauma	Needle-induced lesion		Cx	Ms	At injury site: Mesh like morphology & small cell bodies. At the border: Enlarged soma & thick processes	Topographical, functional	Visual	IHC/IF		Martin-Lopez, Garcia-Marques, Nunez-Llaves, and Lopez-Masaraque (2013)
TBI	Lateral fluid percussion		WM, Hip, Cx, Th	R	Intertwined processes in Hip & Cx; thick shortened processes in Th. No vimentin induction in Th	Regional, disease stage	Visual	Cajal gold sublimate stain, dot-blot	S100 β , vimentin	Hill, Barbarese, and McIntosh (1996)

(Continues)



TABLE 3 (Continued)

Levels of observed heterogeneity	Disease modeled	Experimental model	CNS region	Species	Examples of heterogeneity	Additional levels of heterogeneity	Hypertrophy observed? Method used	GFAP observed? Method used	Others markers of reactive astro	References
Signaling	Peripheral nerve injury	Purified astro treated with EphB1 or IL6	Cx	Ms	EphB1 (but not IL6) induces protective transcriptional profile in astro via STAT3 signaling	Molecular, functional	Visual	IHC/IF, WB	EphB1/STAT3	Tyzack et al. (2017)
Stroke	MCAO		Cx	Ms	Only Notch1-STAT3-ETBR ⁺ reactive astro proliferate	Functional	Visual	IHC/IF, WB	Jagged1	LeComte, Shimada, Sherwin, and Spees (2015)
Stroke	Phototrombosis		Cx	Ms	Only Thbs4 ⁺ reactive astro proliferate in SVZ via Notch1-Nfia signaling	Functional	Visual	IHC/IF	Thbs4	Benner et al. (2013)
Trauma	SWI		Cx	Ms	Only galectin 1 & 3 ⁺ reactive astro proliferate	Functional	Visual	IHC/IF	Galectins	Sirko et al. (2015)
SCI	Contusion		SC	Ms	Type I collagen ⁺ astro induce scar formation via N-cadherin pathway. Not active in hypertrophic reactive astrocytes	Topographical, molecular, functional	Visual	IHC/IF, WB	Cdh2, Ctnnb1...	Hara et al. (2017)
Molecular	Neuroinfla.	Immunopanned astro LPS-treated mice	Ms		"A1" neurotoxic reactive astro induced by microglia. "A2" reactive astro express different genes, function uncharacterized	Functional	Visual	IHC/IF, qPCR	A1 & A2 panels + pan markers	Liddelov et al. (2017)
Functional	NWMI	Hypoxic-ischemic encephalopathy	Cx	H	"A2" reactive astro induce OPC maturation arrest via COX2-PGE2 signaling		Visual	IHC/IF, qPCR	COX2	Shiow et al. (2017)
Brain metastasis	Tumor resection		Cx	H	pSTAT3 ⁺ astro reduce immune cell recruitment to metastases	Signaling	Visual	IHC/IF	pSTAT3	Priego et al. (2018)
MS, multifocal encephalopathy	/		WM	H	Some reactive astro uptake myelin & produce more cytokines		Visual	IHC/IF		Ponath et al. (2017)

This table presents a selection of relevant studies, performed mostly *in vivo*, to illustrate heterogeneity of astrocyte reactions. Different levels of observed heterogeneity can be listed as originally proposed by Anderson, Ao, and Sofroniew (2014). In addition, differences in responses are observed depending on disease stage or age (temporal), species, and gender. Interestingly, several levels of heterogeneity may co-exist (see Additional levels of heterogeneity). Most of the time, the reactive state of astrocytes was established by GFAP overexpression and morphological changes. Morphological changes were estimated qualitatively (visual), unless mentioned in the table. Some studies identified additional markers of reactive astrocytes (or subtypes). Abbreviations (by lexical field): CNS regions: Cb, cerebellum; Cx, cortex; Hip, hippocampus; SC, spinal cord; Str, striatum; Th, thalamus; WM, white matter. Diseases: AD, Alzheimer disease; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; MS, multiple sclerosis; NWMI, neonatal white matter injury; Neuroinfla., neuroinflammation; PD, Parkinson disease; SCI, spinal cord injury; TBI, traumatic brain injury. *Experimental models*: EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; KA, kainate; LPS, lipopolysaccharide; MCAO, middle cerebral artery occlusion; SWI, stab wound injury. *Species*: H, human; Mc, macaque; Mm, mammalian; Ms, mouse; R, rat. *Other fields*: Astro: astrocytes; CSPG: chondroitin sulfate proteoglycans; IHC/IF, immunohistochemistry or immunofluorescence; IR, immunoreactivity; n.m., not measured; WB, Western Blotting; =, unchanged; ↑, increase.

they are in direct contact with the lesion in SCI [(Wanner et al., 2013), Figure 2f], are exposed to blood-borne substrates following SWI (Sirko et al., 2013), or their cell bodies are in apposition to blood vessels (Bardehle et al., 2013). Notably, proliferative astrocytes perform only one or two rounds of division (Bardehle et al., 2013; Sirko et al., 2013). Two-photon microscopy also showed that reactive astrocytes do not migrate like microglia or macrophages do after a focal mechanical injury (Bardehle et al., 2013; Nimmerjahn, Kirchhoff, & Helmchen, 2005). Similarly, in the spinal cord, astrocytes remain in their allocated regional domain and do not migrate to a nearby SWI (Tsai et al., 2012).

4.4 | Timescale

Increased GFAP and nestin protein expression is detected as soon as 90 min after mouse euthanasia and preparation of acute slices, showing that molecular changes may occur rapidly (and even *ex vivo*) (Takano et al., 2014). In addition, in different striatal injury models caused by acute neurotoxin injection, *Gfap* mRNA levels are induced 6 hr later, while GFAP protein levels increase significantly only after 12–72 hr, depending on the model (O'Callaghan, Kelly, VanGilder, Sofroniew, & Miller, 2014). Astrocyte reaction can be viewed as a change of state or a conversion (Table 1). By becoming reactive, astrocytes undergo a set of morphological, transcriptional, and functional changes that transform them into different cells, with acquired, lost or altered properties and functions (see Section 8). This is different from a rapid stimulation by neurotransmitters, for example, which will produce transient movements of perisynaptic processes (Bernardinelli et al., 2014), Ca^{2+} signals, or gliotransmitter release (Araque et al., 2014). This physiological response (which is better qualified as activation, see Table 2 and Section 2), will not necessarily be long lasting or associated with large-scale transcriptional changes that shift astrocyte phenotype. On the contrary, reactive astrocytes may persist over months and even years in chronic brain diseases, although they may evolve overtime.

4.5 | Reversibility

Astrocyte reaction is reversible and may resolve. Manipulation of specific signaling cascades *in vitro* and *in vivo* can normalize the transcriptome of astrocytes. Whether such “de-activated” astrocytes are truly normal or are in a different state remains to be fully explored. Indeed, it is known that a given stimulus has a different effect on astrocytes, when they were previously exposed to a first injury, a process known as priming (Hennessy et al., 2015). A very elegant study recently showed that grafting reactive astrocytes in a normal mouse spinal cord is sufficient to revert them to a nonreactive state (Hara et al., 2017). Conversely (but less surprising), grafting normal astrocytes in an injured environment turns naïve astrocytes into reactive astrocytes based on both morphological and molecular criteria, showing that reactive astrocytes are plastic and regulated by environmental cues. Among the reported signals involved in maintaining a nonreactive state or resolving astrocyte reaction are fibroblast growth factor (Kang et al., 2014), $\beta 1$ integrin (Hara et al., 2017; Robel et al., 2009), transforming growth factor α (Rothhammer et al., 2018),

microbiome-derived tryptophan metabolites (Rothhammer et al., 2016), suppressor of cytokine signaling 3 [SOCS3, (Ceyzériat et al., 2018)], or Sonic Hedgehog [SHH, (Garcia, Petrova, Eng, & Joyner, 2010)]. Such signaling molecules offer unique opportunities to tune astrocyte reaction and evaluate the consequences on specific outcomes in different disease models (see Section 8).

5 | DO ALL ASTROCYTES REACT THE SAME WAY?

As nearly all surveyed researchers noted (Table 1), the global expression “reactive astrocytes” falls short of describing the different responses that astrocytes may express in different disease conditions or even in response to the same stimulus (Table 3). As Prof. A. Messing puts it, citing Leo Tolstoy, “All happy families are alike; each unhappy family is unhappy in its own way,” suggesting that astrocytes react in a specific manner in each pathological situation. This was nicely illustrated by two-photon monitoring of astrocyte responses following focal SWI. All astrocytes proximal to the lesion became hypertrophic but only half of them polarized their processes toward the lesion, the other half remained static and only 10% of them underwent proliferation [(Bardehle et al., 2013), Figure 2h]. Likewise, a lineage tracing method was used to determine whether astrocytes derived from the same developmental clone display similar morphological changes following SWI or experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). In both cases, reactive astrocytes from the same clone tended to behave similarly, indicating that they are controlled by intrinsic cues established during development. However, some astrocytes reacted differently than other cells in the same clone, showing that environmental signals further diversify astrocyte response [(Bribian et al., 2018; Martin-Lopez et al., 2013), Figure 2b].

The heterogeneity of reactive astrocytes is also evidenced by spatial gradients in the intensity of response, which culminates at the core of ischemia injury, SCI, mechanical lesion, or epileptic focus (see Figure 2a for example). This is defined as topographical heterogeneity (Anderson et al., 2014) and is basically determined by the distance to the injury core. As the concentration of molecular stimuli decreases with distance to the injury core, so does astrocyte reaction, at least based on morphological changes or GFAP induction (see Table 3). As Prof. S. Sirko explains it “as in Newton's third law, the action and the reaction [of astrocytes] are equivalent in magnitude.” But, this apparent continuum in the intensity of astrocyte reaction may in fact hide different, discrete reactive states. For example, proliferative reactive astrocytes are only found proximal to the lesion [(Herrmann et al., 2008; Wanner et al., 2013), Figure 2f]. Nearly 10 years ago, Prof. M. Sofroniew described three categories of astrocyte reactivity: mild to moderate; severe diffuse, and severe with glial scar. It was a noticeable effort to better define this process and recognize its heterogeneity (Sofroniew & Vinters, 2010). This classification is based on measurable criteria (proliferation, process extension, maintenance or loss of exclusive 3D domains) but there is no absolute quantitative categories (e.g., to what extent astrocytes need to elongate their processes to fall into the mild

or severe category?). This classification may thus be difficult to translate to any disease or model, and does not take advantage of objective molecular markers. Indeed, it was recently shown that reactive astrocytes that form the glial scar and lose their 3D domain have a different molecular profile than hypertrophic reactive astrocytes located farther away. “Scar-forming” astrocytes express specific transcripts such as chondroitin sulfate proteoglycans (e.g., *Acan*, *Pcan*) and N-Cadherin (*Cdh2*), while hypertrophic reactive astrocytes express several members of the β -catenin pathway (e.g., *Ctnnb1*, *Plaur*) (Hara et al., 2017). Interestingly, both types of reactive astrocytes overexpress *Gfap* and *Vim* compared to normal astrocytes (Hara et al., 2017). In addition, scar-forming astrocytes proliferate more than more distant hypertrophic reactive astrocytes [see Section 6, Table 3, (Wanner et al., 2013)]. Overall, these data suggest that the scar-forming astrocytes are a specific reactive astrocyte subtype and not a mere exacerbation of hypertrophic reactive astrocytes.

Other sources of heterogeneity have been described, such as regional differences, even more than 20 years ago (Table 3). Astrocytes from different CNS regions exposed to the same toxic stimulus (Amyloid β) respond differently in vitro (Hoke et al., 1994), showing that astrocyte heterogeneity is at least partially intrinsic, as it is maintained in a dish. Likewise, astrocytes from gray and white matter react differently to SWI (Mattugini et al., 2018). This could be due to preexisting differences between astrocytes from distinct brain regions (Boisvert, Erikson, Shokhirev, & Allen, 2018; Chai et al., 2017; Itoh et al., 2018; John Lin et al., 2017; Lanjakornsiripan et al., 2018; Morel et al., 2017; Torigoe, Yamauchi, Zhu, Kobayashi, & Murakami, 2015). Another demonstration of different molecular classes of reactive astrocytes came from the Barres laboratory. They reported that the molecular changes induced in astrocytes by LPS injection or MCAO only partially overlap (Zamanian et al., 2012). This led to the description of A1 and A2 reactive astrocytes, each characterized by a set of 10–13 genes, in addition to a panel of 10–13 common genes (i.e., pan reactive) including *Gfap*, *Vimentin*, and *Serpina3n* (Liddel et al., 2017). The molecular profile of LPS-induced A1 reactive astrocytes was replicated quite faithfully by treating immunopanned rodent astrocytes with interleukin 1 α (IL1 α), complement 1q (C1q), and tumor necrosis factor (TNF) (Liddel et al., 2017). A detailed functional characterization of A1 reactive astrocytes showed that they release factors that are toxic to neurons and oligodendrocytes, are less synaptogenic and have defective phagocytosis. But, this dual classification may be quite restrictive to define other potential types of reactive astrocytes existing in the complex world of brain diseases (Cunningham, Dunne, & Lopez-Rodriguez, 2018). Indeed, many intermediate molecular profiles were observed after treatment of immunopanned astrocytes with different molecules, not only A1 or A2 (Liddel et al., 2017). In a complex in vivo multicellular environment with multiple stimuli, reactive astrocyte diversity may even be stronger. Both A1 and A2 genes are induced concomitantly in different models, such as mouse models of AD (Ceyzeriat et al., 2018), Tauopathy (Litvinchuk et al., 2018), or ischemia (Liddel et al., 2017).

Overall, some markers may display graded changes, proportional to the intensity of the initial injury [GFAP, cytokines, (Sofroniew, 2014a)], while others may undergo an all-or-none response, being

present only in some forms of reaction [e.g., A1 versus A2 reactive astrocytes (Liddel et al., 2017); scar-forming versus hypertrophic reactive astrocytes (Hara et al., 2017), ephrin type-B receptor 1 (EphB1) versus interleukin (IL)6-induced reactive astrocytes (Tyack et al., 2017), Table 3].

There are several origins and several manifestations of reactive astrocyte heterogeneity (Figure 3, Table 3). Indeed, as stated by Prof. A. Volterra “the combination of the intrinsic features of a given astrocytic population, of its microenvironment and the type of insult will concur to produce different types of reactivity and different functional outcomes.” More precisely, astrocyte reaction is determined by core changes (induction of *Gfap* expression, morphological plasticity), combined with disease-specific changes on a preexisting heterogeneous background (Figure 3), resulting in an extreme variety of possible reactive astrocyte subtypes. This leads us to the next question, very central to the field.

6 | WHAT ARE THE APPROPRIATE MARKERS OF REACTIVE ASTROCYTES?

As discussed earlier, GFAP overexpression and morphological changes are the most commonly used reactive astrocyte markers (Liddel & Barres, 2017). Both are easy to monitor on different types of samples (see Figure 2, Table 3). *Gfap* is one of the most consistently induced gene in transcriptomic datasets of reactive astrocytes, confirming its usefulness as a reactive marker [(Hol & Pekny, 2015; Liddel et al., 2017; Orre, Kamphuis, Osborn, Jansen, et al., 2014; Zamanian et al., 2012), see also Table 3 and Section 4]. It is important to note, however, that the level of *Gfap* induction can be very different between conditions (see Table 3 and Section 5) or even between cells (Pekny, Wilhelmsson, Tatlisumak, & Pekna, 2019), but GFAP expression globally increases at the population level, in a wide range of brain diseases.

Are GFAP induction and morphological changes enough to identify reactive astrocytes? Several surveyed PIs think that these indexes can be misleading (Table 1). Indeed, additional markers would be helpful with some specific forms of reactive astrocytes that display unconventional morphological alterations or lower GFAP immunoreactivity (see Section 9). In addition, they would be useful to define specific types of reactive astrocytes. Genome-wide transcriptional profiling can identify potential common and class-specific genes (Hara et al., 2017; Liddel et al., 2017). How many markers are needed to define a class? For example, of the ~10 genes forming the A1 and A2 panels, should they all be induced in a given condition to qualify a cell as an A1 reactive astrocyte or 2–3 are enough? In fact, the expression of only a few protein markers (Complement 3, Complement factor b, and MX dynamin-like GTPase 1) was tested in the brain of patients and these three genes were not in the original A1 panel [(Liddel et al., 2017), Figure 2t,u]. When the full panel of A1 genes is tested, not every single gene of the A1 cassette is induced in several diseases, like in vitro and in vivo models of Parkinson disease (Yun et al., 2018) or AD mouse models (Ceyzeriat et al., 2018). In addition, individual

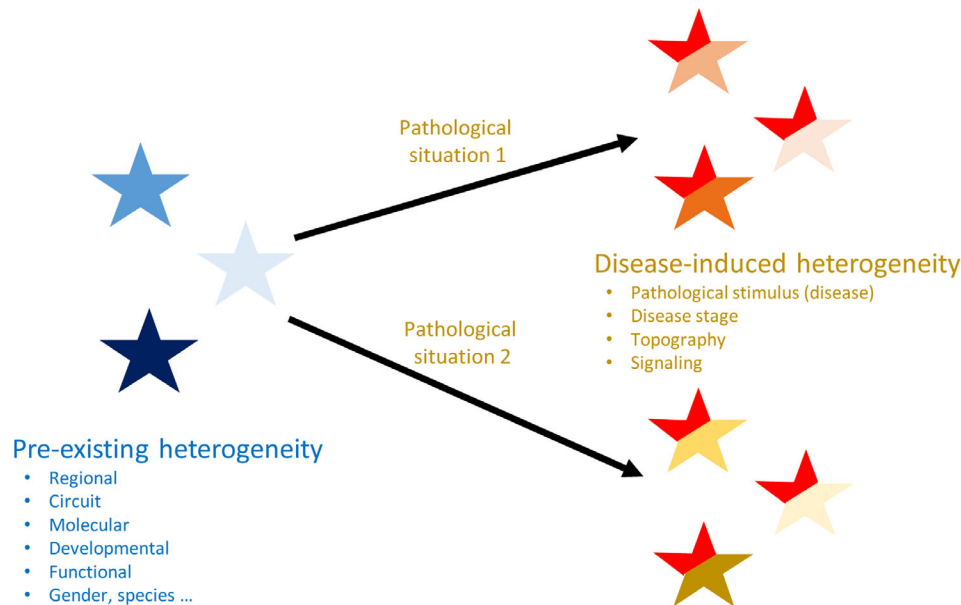


FIGURE 3 Heterogeneity of reactive astrocytes: Causes and manifestations. Normal astrocytes are already heterogeneous due to different sources of diversity [listed in blue, see (Ben Haim & Rowitch, 2017), for references]. Upon injury or disease, astrocytes display even more heterogeneity (listed in brown), depending on the exact molecular trigger (e.g., open versus closed injury, extracellular cytokines versus intracellular aggregated proteins, aberrant neuronal activity versus cell death), their distance from it (topography), the exposure time to this stimulus (disease stage), and the signaling cascades activated. The combination of preexisting and induced heterogeneity gives rise to potentially very diverse populations of reactive astrocytes with unique molecular and functional features. However, there are some core changes that are common to most forms of reactive astrocytes (e.g., GFAP induction, morphological changes, represented in red)

reactive astrocytes co-expressing A1 and A2 genes are observed in the MCAO rodent model and in the aging mouse brain (Clarke et al., 2018), suggesting that it may be difficult to define classes of reactive astrocytes with only a few genes.

To improve the panel of reactive astrocyte molecular markers, it would be useful to extend the transcriptomic analysis of reactive astrocytes performed by Zamanian et al. (2012) in LPS and MCAO models, to many different, genetic and sporadic, acute and chronic, degenerative and inflammatory diseases. It would help define with greater power the core sets of genes systematically induced or down regulated in reactive astrocytes, and identify disease-specific markers. Of course, such analysis would provide even more insight if performed on human samples. However, post mortem delays induce noise and artifacts and the physical isolation of astrocytes is quite difficult, although it may be possible to gain some insight into astrocyte-specific transcriptomic changes by co-expression analysis on bulk samples (Kelley, Nakao-Inoue, Molofsky, & Oldham, 2018). A method of choice to study cell diversity at the molecular level is single-cell RNAseq (scRNAseq) (Svensson, Vento-Tormo, & Teichmann, 2018) or single-nuclei RNAseq (Habib et al., 2017). These methods have gained significant momentum, and several landmark papers have reported brain cell heterogeneity, including glial cells, throughout development or between regions (Macosko et al., 2015; Pollen et al., 2014; Zeisel et al., 2018). There are only few articles on brain diseases, and to date, only on other glial cells like microglia (Hammond et al., 2018; Masuda et al., 2019). Such unsupervised approaches will help define

populations of reactive astrocytes with associated gene markers in different conditions (see Section 13).

Another option to classify reactive astrocytes is to combine molecular with functional indexes. A good example is the variable capacity of reactive astrocytes to proliferate. As mentioned earlier, only a subset of reactive astrocytes undergoes cell division. These proliferative astrocytes may thus be considered as a different class, of particular interest because they may repopulate the damaged brain (see Section 10). But other specific functions (either gained, lost or altered, see Section 8) may also serve as functional markers of reactive astrocytes, like enhanced phagocytic capacities around plaques, as shown for “disease associated microglia” (Keren-Shaul et al., 2017). For example, only a fraction of reactive astrocytes phagocytose myelin debris in the brain of patients with MS or leukoencephalopathy [(Ponath et al., 2017), Figure 2n]. A classification based on production of γ -amino-butyric acid (GABA) and brain-derived neurotrophic factor by reactive astrocytes was proposed by Prof. C. J. Lee [see Table 1, and Supplemental Text, (Chun et al., 2018)], since reactive astrocytes produce more GABA in AD (Jo et al., 2014; Wu, Guo, Gearing, & Chen, 2014). This is a potentially interesting functional classification of reactive astrocytes, but it needs to be further explored, to evaluate whether this is translatable to multiple diseases, animal models, and of course patients. For example, contrary to AD models, astrocyte GABA production is reduced in a mouse model of Huntington disease [HD, (Jo et al., 2014; Wojtowicz, Dvorzhak, Semtner, & Grantyn, 2013)]. Importantly, a good marker needs to be easy to use and compatible with other exploratory

techniques like electrophysiology or functional imaging. Therefore, mRNA and protein markers remain favored options.

A problem that may be very difficult to overcome is the dynamic, flexible, and context-dependent phenotype of astrocytes. It was nicely discussed for astrocytes in physiology (Poskanzer & Molofsky, 2018), and it may even be exacerbated in disease, when astrocytes express gene markers of other cell types and cell identities become blurrier (see Section 10). It may thus be impossible to establish fixed classes and we rather should try to define states, dependent on previous phenotype, activated signaling, and environment (see Figure 3). The ambitious Human Cell Atlas project that aims to define all cells in the human body with a range of single-cell approaches will probably provide the astrocyte field with new tools and concepts to better address the challenge of reactive astrocyte classification.

7 | WHAT ARE THE MOLECULAR CASCADES TRIGGERED IN REACTIVE ASTROCYTES?

First, astrocytes sense a pathological signal. This signal can be extracellular (e.g., cytokines, purines, aggregated proteins, and myelin debris), trans-cellular (e.g., transmembrane adhesion molecules like ephrins or integrins), membrane bound [e.g., phosphatidylserine (Chung et al., 2013)], as well as intracellular (e.g., aggregated proteins, nucleic acids from infecting pathogens, ions like Ca^{2+}), [see (Buffo, Rolando, & Ceruti, 2010; Cunningham et al., 2018; Kang & Hebert, 2011; Sofroniew, 2014a) for review]. Interestingly, a recent study reported that astrocytes are also very sensitive to environmental pollutants (Wheeler et al., 2019). To sense all these molecular triggers, astrocytes are equipped with a wide range of membrane or intracellular receptors, including G Protein-coupled receptors (like metabotropic glutamate or P2Y purinergic receptors), ionotropic receptors (e.g., P2X purinergic receptors), multimeric cytokine receptors (e.g., IL6 family receptors), Toll like receptors [although their expression by astrocytes is quite disputed (Cunningham et al., 2018)], or tyrosine kinase receptors (e.g., Epidermal growth factor receptor), [see (Kang & Hebert, 2011; Verkhratsky & Nedergaard, 2018) for review]. It is important to note, however, that there is rarely a direct and formal demonstration that each of these stimuli can trigger a full reactive program (i.e., resulting in morphological as well as complex transcriptional changes), without the involvement of other cell types like microglia. Indeed, this is typically tested by applying high doses of these compounds in vitro or through injection or overexpression in vivo. It is therefore difficult to know whether they activate astrocytes directly or through microglial cells (see Section 11). Interestingly, astrocytes are also mechano-sensitive. They can detect changes in their environment mechanical properties, discriminate soft from stiff material, and adjust by changing their own stiffness (Moeendarbary et al., 2017; Moshayedi et al., 2014).

After stimulus sensing, a step of signal transduction takes place and converge to the nucleus. This can occur through direct shuffling of activated down-stream transcription factors to the nucleus after

phosphorylation, dephosphorylation, or release from inhibitors. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), nuclear factor κB (NF- κB), and nuclear factor of activated T-cells (NFAT), the downstream effectors of the Janus kinase (JAK)-STAT3, NF- κB , and calcineurin-NFAT pathways respectively, are regulated by such a mechanism (Ceyzeriat, Abjean, Carrillo-de Sauvage, Ben Haim, & Escartin, 2016; Sompol & Norris, 2018; Zhang, Lenardo, & Baltimore, 2017). Many signaling cascades are associated with astrocyte reaction (Ben Haim, Carrillo-de Sauvage, Ceyzeriat, & Escartin, 2015; Buffo et al., 2010; Kang & Hebert, 2011), but the STAT3 pathway seems to play a prominent role in different disease conditions, acting as a master regulator of reactive astrocytes [(Ben Haim, Ceyzeriat, et al., 2015; Ceyzeriat et al., 2016; Herrmann et al., 2008), Figure. 2o]. Ca^{2+} signaling may also be involved in astrocyte reaction. Ca^{2+} can activate or inhibit many downstream signaling intermediates like the phosphatase calcineurin (Sompol & Norris, 2018) or the transcriptional repressor Pumilio 2 (Kanemaru et al., 2013), which will activate other downstream pathways like the NFAT or N-cadherin pathways, respectively, and trigger important transcriptional changes.

Activation of specific transcription factors will induce expression of target genes such as *Gfap* or cytokines but also of transcription factors or retro-inhibitors of other pathways (e.g., SOCS3 for the JAK-STAT3 pathway or I κB for the NF- κB pathway), which will further shape the transcriptome of reactive astrocytes. This step may involve successive waves of transcriptional regulation, starting with induction of immediate early genes (Jenab & Quinones-Jenab, 2002; Priller, Reddington, Haas, & Kreutzberg, 1998; Wu, Pan, Zuo, Li, & Hong, 2017), followed by subsequent waves of gene induction. The transcription of some genes may be repressed. Indeed, the number of down-regulated genes may even be higher than those over-expressed, as observed AD mouse astrocytes (Orre, Kamphuis, Osborn, Jansen, et al., 2014). Importantly, the precise time course of transcriptional induction is not very well known. It was established for specific transcripts or proteins (mostly GFAP and cytokines) in mice exposed to neurotoxins (O'Callaghan et al., 2014) or LPS (Biesmans et al., 2015; Norden, Trojanowski, Villanueva, Navarro, & Godbout, 2016). Transcriptional profiling of astrocytes was performed in a mouse model of epilepsy, in two brains regions and three time points following pilocarpine injection (Clasadonte et al., 2016). This extensive analysis showed subtle differences between disease stages or brain regions (see Table 3). Such genome-wide, longitudinal analysis of relevant in vivo models of other brain diseases would provide key insight into the temporal regulation of astrocyte reaction.

Some changes observed in reactive astrocytes do not require transcriptional induction, such as morphological plasticity. The molecular mechanisms underlying astrocyte morphological changes and process motility are mostly studied in vitro, where these cells are grown in 2D and usually have a much simpler morphology (sometimes even no processes) [see (Schiweck, Eickholt, & Murk, 2018), for review]. But in vivo, reactive astrocytes do not migrate [(Bardehle et al., 2013), Section 2] and show little motility of main processes compared to microglia (Nimmerjahn et al., 2005), calling for in vivo validation of the signaling described in vitro. For example, knockout of the Rho GTPase

cdc42 reduces astrocyte polarization in vitro in the scratch wound assay, while it exacerbates it after SWI in vivo (Robel, Bardehle, Lepier, Brakebusch, & Gotz, 2011). As mentioned earlier (Section 3), reactive astrocytes not only present hypertrophy, but also subtle morphological changes. For example, reactive astrocytes retract their processes following stimulation of Slit-Robo signaling by neuroblasts migrating from the subventricular zone after stroke. This cdc42-dependent remodeling of astrocyte cytoskeleton facilitates neuroblast migration toward lesion sites (Kaneko et al., 2018).

Less is known about mechanisms of epigenetic regulation in reactive astrocytes in disease. Based on what happens during astrocyte development, it is suspected that epigenetic processes (chromatin remodeling through DNA methylation or histone posttranslational modifications, as well as expression of regulatory microRNA) could influence astrocyte conversion into reactive cells (Neal & Richardson, 2018).

The profound transcriptional changes occurring in reactive astrocytes translate into functional alterations that may impact virtually all astrocyte functions.

8 | DO REACTIVE ASTROCYTES DO GOOD THINGS?

Reactive astrocytes are the usual suspects in many diseases, but they are now considered by many, as beneficial partners for neurons, as illustrated in Table 1. An overview of the literature shows that depending on the strategy employed to modulate reactive astrocytes (e.g., pharmacological or genetic approaches, targeting of astrocyte proteins or signaling pathways, ablation of astrocytes), the outcomes vary (Ben Haim, Carrillo-de Sauvage, et al., 2015; Cunningham et al., 2018). Of course, the disease studied and its model itself (e.g., transgenic versus knock-in, in vivo versus in vitro, species) will influence how astrocyte reaction will play out. More importantly, some models do not reproduce astrocyte reaction well. For example, most HD mouse models do not display reactive astrocytes, while GFAP upregulation is robustly detected in the caudate-putamen of HD patients (Faideau et al., 2010; Selkoe, Salazar, Abraham, & Kosik, 1982; Vonsattel et al., 1985). This could be due to low GFAP expression in the mouse striatum compared to other brain regions (Chai et al., 2017), significant species differences (Oberheim et al., 2009; Zhang et al., 2016) or a simple failure of mouse models to recapitulate all HD features.

How do reactive astrocytes functionally impact the diseased brain? Virtually all astrocyte functions are reported to be altered in disease: neurotransmitter uptake (Escartin et al., 2006; Sheldon & Robinson, 2007), gliotransmitter release (Jo et al., 2014; Wu et al., 2014), metabolic activity (Escartin et al., 2007; Gavillet, Allaman, & Magistretti, 2008; Valenza et al., 2010), ion buffering (Tong et al., 2014), release of cytokines, complement factors or trophic factors (Chou et al., 2008; Lian et al., 2015; Sofroniew, 2014b), phagocytosis (Gomez-Arboledas et al., 2018; Liddel et al., 2017; Morizawa et al., 2017), production, and detoxification of reactive oxygen species [ROS, (Allaman et al., 2010; Cassina et al., 2008; Ye et al., 2015)].

These functions may be enhanced or reduced by the reactive state. For example, reactive astrocytes may display enhanced or reduced connectivity through gap junctions, depending on the disease (Escartin & Rouach, 2013; Pannasch & Rouach, 2013). They may display deficits in glutamate uptake (Sheldon & Robinson, 2007), or show enhanced uptake capacity when reaction is induced by the cytokine ciliary neurotrophic factor (CNTF) (Escartin et al., 2006). Reactive astrocytes may release more GABA in AD mice (Jo et al., 2014; Wu et al., 2014) or do the opposite in HD mice (Wojtowicz et al., 2013).

It is beyond the scope of this review to list all their described functional changes and contributions to specific diseases. Readers are referred to recent reviews on astrocytes in HD (Khakh et al., 2017), AD (Chun & Lee, 2018; Osborn, Kamphuis, Wadman, & Hol, 2016; Perez-Nievas & Serrano-Pozo, 2018), MS (Wheeler & Quintana, 2019), SCI (Adams & Gallo, 2018; Sofroniew, 2018), TBI (Burda, Bernstein, & Sofroniew, 2016), stroke (Pekny et al., 2019), and epilepsy (Coulter & Steinhauser, 2015; Robel & Sontheimer, 2016). In general, deficits in normal astrocyte functions are reported and the existence of “killer astrocytes” releasing toxic molecule(s) was even proposed in amyotrophic lateral sclerosis [ALS, (Haidet-Phillips et al., 2011; Nagai et al., 2007)] and other neurodegenerative diseases [(Liddel et al., 2017), see Section 5]. But, there is also strong evidence for beneficial reactive astrocytes in acute or chronic diseases. For example, over the years, the Sofroniew laboratory has convincingly demonstrated that scar-forming reactive astrocytes demarcate damaged tissue (Bush et al., 1999; Faulkner et al., 2004) and even promote axonal regrowth through the lesion (Anderson et al., 2016). Likewise, STAT3-dependent reactive astrocytes reduce degeneration of axotomized motoneurons in the facial motor nucleus, and promote synapse maintenance through thrombospondin 1 release (Tyzack et al., 2014). CNTF-induced reactive astrocytes display enhanced glutamate uptake, promote metabolic resilience, and protect neurons against excitotoxicity (Beurrier et al., 2010; Escartin et al., 2006; Escartin et al., 2007). Even A1 neurotoxic reactive astrocytes may have some beneficial roles in specific diseases, for example by killing damaged, dysfunctional, or infected neurons (Liddel et al., 2017).

A way to study common functional features of reactive astrocytes is to activate (or inhibit) a specific signaling pathway to trigger reactive conversion (see Section 8). For example, JAK-STAT3 pathway activation in astrocytes induces many reactive markers and is sufficient to alter synaptic transmission and plasticity in the hippocampus (Ceyzeriat et al., 2018). Activation of the NF- κ B pathway by expression of a constitutive form of the upstream I κ B kinase in adult astrocytes also induces a reactive profile and Purkinje cell loss in the cerebellum (Lattke et al., 2017; Oeckl, Lattke, Wirth, Baumann, & Ferger, 2012). Such approaches are useful to isolate functional changes in reactive astrocytes, independently of a specific disease condition. Alternatively, blocking astrocyte reaction may help uncover the net effect of reactive astrocytes in each disease context [see (Ben Haim, Carrillo-de Sauvage, et al., 2015)]. This requires an efficient strategy that (a) only impacts the reactive state and not normal astrocyte functions, (b) does not affect other cell types, and (c) inhibits all (or only the targeted) classes of reactive astrocytes. With new and

maybe more selective molecular markers, it will be important to extensively validate the efficiency and universality of such methods and determine how these “de-activated” astrocytes are different from nonreactive astrocytes.

Overall, the range of functional changes displayed by reactive astrocytes and their effects on disease are extremely large. They are governed by the preexisting astrocyte molecular and functional profile, in addition to the pathological trigger itself (Figure 3, Section 5). Indeed, even reactive astrocytes activated by the same pathway can have different effects on specific disease outcomes. STAT3 signaling in reactive astrocytes has detrimental effects in mouse models of AD (Ceyzeriat et al., 2018; Reichenbach et al., 2019), or hypoxia (Hristova et al., 2016), no significant effect in the context of acute mitochondria toxicity (O’Callaghan et al., 2014) but has beneficial effects in neonatal white matter injury (Nobuta et al., 2012), after SCI, by promoting glial scar formation (Anderson et al., 2016; Herrmann et al., 2008; Okada et al., 2006), and in HD models, by reducing mutant Huntingtin aggregation (Ben Haim, Ceyzeriat, et al., 2015). Intriguingly, a recent study by Tyzack et al. (2017) suggested that the upstream activator (IL6 or EphB1-ephrine-B1 signaling) controls the final molecular profile induced by STAT3 in reactive astrocytes (Table 3).

It is now important to define what reactive astrocytes do in each situation and the underlying signaling cascades, before targeting these cells for therapy. There are new opportunities and yet many challenges to use reactive astrocytes for therapeutic purposes.

9 | DO REACTIVE ASTROCYTES EVENTUALLY DIE?

There may be extreme forms of responses leading to the loss of key astrocyte proteins and functions or even their death. Astrocytes are considered more resilient than neurons, but they may degenerate as well. As seen with TUNEL or caspase stainings, astrocytes may undergo apoptotic cell death in ischemia (Giffard & Swanson, 2005), in ALS mice (Rossi et al., 2008), or in the brain of AD patients (Perez-Nievas & Serrano-Pozo, 2018). Alternatively, mouse astrocytes may die by necrosis at the infarct core after stroke (Lukaszevicz et al., 2002).

Major alterations of astrocyte morphology, including severe process atrophy or fragmentation, swollen or vacuolated cell bodies are described in brain samples from patients with AD, stroke or infection, for example, and it is called clasmatodendrosis [see references in (Perez-Nievas & Serrano-Pozo, 2018; Tachibana et al., 2019)]. It is also reproduced in animal models of these diseases (Olabarria et al., 2010; Sullivan, Bjorkman, Miller, Colditz, & Pow, 2010). In addition, astrocytes may be directly or primarily targeted by the disease process, like in Alexander disease caused by *Gfap* mutation (Messing, 2018) or *neuromyelitis optica* caused by autoantibodies against the astrocyte protein aquaporin 4 [see (Verkhratsky, Zorec, & Parpura, 2017) for a complete review].

Interestingly, in a mouse model of tauopathy (Bussian et al., 2018) and in AD patients (Bhat et al., 2012), astrocytes express markers of cellular senescence (p16^{INK4a} and β -galactosidase). Genetic ablation of

senescent cells prevents tau pathology and cognitive decline (Bussian et al., 2018), suggesting that they have deleterious effects. It is not possible, however, to know whether senescent astrocytes are responsible alone or if senescent microglia also play a role. Interestingly, interleukins IL6 and IL1 β are classic senescence markers (Salminen et al., 2011) and senescent astrocytes in AD brains express high levels of GFAP (Bhat et al., 2012), suggesting that senescence could be yet another specific reactive state.

Overall, such atypical astrocyte responses characterized by major loss of key homeostatic astrocyte proteins, senescence and/or altered morphology will need to be further characterized by genome wide and refined temporal analysis to really qualify as a form of astrocyte reaction. Do astrocytes first become reactive and then adopt this dysfunctional, senescent phenotype and die, or these are distinct non-overlapping processes?

10 | WHERE DO REACTIVE ASTROCYTES COME FROM OR WHAT DO THEY BECOME?

Reactive astrocytes are in a very distinct state from astrocytes in physiological conditions. Thus, one may wonder whether reactive astrocytes (a) can further transform into other cell types and (b) come only from the conversion of a nonreactive astrocyte. Both questions have important therapeutic implications, especially if reactive astrocytes are able to generate new neurons.

As mentioned earlier, only a subset of reactive astrocytes proliferates (e.g., juxta-vascular or scar-forming astrocytes), they only undergo one round of division and invariably generate two sister astrocyte cells (see Section 4). Strikingly, the *in vitro* situation is quite different. In a culture medium promoting cell proliferation, acutely isolated reactive astrocytes are able to generate different cell types, including neurons (Gotz, Sirko, Beckers, & Irmeler, 2015). It shows that some permissive signals are lacking in the brain environment [like SHH signaling, (Sirko et al., 2013)] or conversely, that restrictive factors prevent astrocytes from returning to a multipotent state and differentiating into neurons [like Notch signaling, (Magnusson et al., 2014)]. Significant efforts are made to identify and target such factors, to promote the neurogenic potential of reactive astrocytes and their reconstruction of damaged neuronal circuits [for a complete review, see (Lei, Li, Ge, & Chen, 2019)].

Regarding the origin of reactive astrocytes, scar-forming reactive astrocytes were proposed to come from other proliferating cell types, like progenitors cells (Benner et al., 2013; Faiz et al., 2015) or ependymal cells (Sabelstrom et al., 2013). Fate mapping by Cre-reporters or viral targeting suggests that this phenomenon is marginal, with the majority of reactive astrocytes originating from previously labeled astrocytes (Buffo et al., 2008; Ren et al., 2017), but it may be insult-dependent and region-dependent (see Gotz et al., 2015, for a complete discussion).

These two questions are intimately linked to cell identity. At present, there is no single univocal marker for brain cell types [as discussed for reactive astrocytes in Section 6, see (Gotz et al.,

2015), for a complete discussion]. For example, GFAP is also expressed by progenitor cells. A type of thalamic glial cell expresses both Connexin43 and Olig2, which are typical astrocyte and OPC markers, respectively (Griemsmann et al., 2015). Such blurred cell identities are even exacerbated in disease. Reactive astrocytes express nestin and other markers of neural stem cells (Gotz et al., 2015). Likewise, transcriptomic studies reveal that reactive astrocytes overexpress many genes characteristic of microglia (e.g., *Cst7*, *Trem2*, and *Cts*) (Ceyzériat et al., 2018; Orre, Kamphuis, Osborn, Jansen, et al., 2014). Indeed, cells co-expressing astrocyte and microglia markers are observed in the spinal cord of an ALS rat model (Trias et al., 2013), the deafferented mouse hippocampus or the brain of AD, Lewy body dementia, or stroke patients (Wilhelmsson et al., 2017). Moreover, reactive astrocytes may lose some of their defining functional features like input resistance, membrane currents, and gap-junction coupling, as described in human brains and in a mouse model of sclerotic mesial temporal lobe epilepsy (Bedner et al., 2015). They may also express lower levels of key astrocyte proteins, as discussed earlier (Sections 4 and 9), and as shown after mild repetitive TBI with loss of GLT1, GS, KIR4.1, and even GFAP (Shandra et al., 2019). This will complicate their identification as astrocytes.

When astrocytes become reactive, they undergo profound transformations, losing their original features and “disguising” as other cells. Refined fate mapping methods with specific drivers and tight time control will be valuable to trace the origin and future of single astrocytes in disease.

11 | HOW DO REACTIVE ASTROCYTES INTERACT WITH OTHER INNATE IMMUNE CELLS?

The dialogue between reactive astrocytes and other cellular partners involved in inflammation and immunity (e.g., microglia, macrophages, and lymphocytes) is quite complex. It is generally admitted that microglial cells react first to many injury signals, in particular danger-associated and pathogen-associated molecular patterns, and then activate astrocytes through cytokine release (Sofroniew, 2014b). There are several reports of microglial cells driving astrocytes toward a specific reactive state. LPS-activated microglia produce IL1 α , C1q, and TNF and induce A1 reactive astrocytes (Liddelow et al., 2017). But, microglia made reactive by methotrexate chemotherapy induce astrocytes to express A2 genes, not A1 (Gibson et al., 2019). Alternatively, when they release vascular endothelial growth factor B during EAE, microglial cells induce a possibly different deleterious type of reactive astrocyte, which needs to be fully characterized (Rothhammer et al., 2018). In TBI, microglia drives a beneficial form of astrocyte reaction through down-regulation of P2Y1 receptors (Shinozaki et al., 2017).

Overall, these studies suggest that microglia dictate the profile of reactive astrocytes, but it may go the other way around. Indeed, reactive astrocytes overexpress many cytokines, chemokines, and signaling molecules that could activate neighboring microglial cells [(Ceyzériat et al., 2018; Orre, Kamphuis, Osborn, Jansen, et al., 2014;

Zamanian et al., 2012), see Figure 2]. Astrocyte-specific NF- κ B activation induces significant astrocyte reaction that secondarily causes microglia activation (Oeckl et al., 2012; Ouali Alami et al., 2018). Accordingly, astrocytes may become strongly reactive while microglia is barely affected after viral infection (Ortinski et al., 2010), or CNTF exposure (Lavis et al., 2012), showing that astrocytes have the ability to become reactive on their own.

Reactive astrocytes may also interact with peripheral immune cells. A recent study showed that regulatory T cells reduce astrocyte reaction (including A1 markers) after stroke, through amphiregulin, IL6, and STAT3 signaling (Ito et al., 2019). Alternatively, phospho-STAT3⁺ reactive astrocytes found around brain metastatic cells reduce CD8⁺ lymphocyte recruitment and increase the number of CD74⁺ macrophage/microglia, which are more permissive to metastatic proliferation [(Priego et al., 2018), Figure 2r]. Proliferating, juxta-vascular reactive astrocytes were also shown to inhibit monocyte infiltration following SWI (Frik et al., 2018). Using reporters to track expression of two genes typical of different phagocyte states, Locatelli et al. (2018) also showed that astrocytes release factors that convert polarized phagocytes expressing inducible nitric oxide synthase into arginase-expressing cells in vitro.

Overall, reactive astrocytes engage in complex bidirectional communications with other immune cells. It remains to be determined where and when these interactions take place, as peripheral immune cells entry into the brain is tightly regulated. Microglial cells and peripheral immune cells themselves show heterogeneous phenotypes, adding yet another layer of complexity to understand the role of reactive astrocytes in disease (Song & Colonna, 2018).

12 | ARE AGING ASTROCYTES A TYPE OF REACTIVE ASTROCYTES?

The human aging brain displays higher GFAP immunoreactivity and mRNA levels [see references in (Munger et al., 2019)], and it was assumed that aging causes progressive astrocyte reaction. But, this idea is not consensual (see Table 1). It is possible, for example, that the analyzed subjects were exposed to some pathological stimuli (mild trauma, micro-infarcts, inflammation, or infection) that caused GFAP increase, not aging itself. Again, transcriptomics studies in mice provide more comprehensive insight into the changes occurring in astrocytes with aging. Results showed that aging astrocytes express higher levels of genes linked to immunity and inflammation (Boisvert et al., 2018; Orre et al., 2014). Another study showed that 2-year-old astrocytes express several pan and A1 genes at higher levels than young astrocytes (Clarke et al., 2018). Aging astrocytes also display reduced expression of some genes linked to cholesterol or ROS detoxification (Boisvert et al., 2018; Clarke et al., 2018). But overall, the molecular changes occurring in aging mouse astrocytes are rather limited. Interestingly, there are regional differences, with larger variations in hippocampal and striatal astrocytes than in their cortical counterparts, even if *Gfap* is induced in all brain regions (Boisvert et al., 2018; Clarke et al., 2018). A genome-wide study in Humans also evidenced

significant, region-dependent changes in astrocyte-specific genes with aging (Soreq et al., 2017).

When analyzed in a healthy aging brain, astrocytes display mild reactive changes. However, aging astrocytes have a high probability to have encountered previous pathological conditions in their lifetime, and they may thus be in a primed state that will change their subsequent response (Cunningham et al., 2018). Astrocyte reaction and possible priming in the aging brain need to be thoroughly analyzed, as aging is a major risk factor for several brain diseases.

13 | WHICH NEW APPROACHES AND TOOLS WILL MOVE THE FIELD FORWARD?

There are now many techniques and models to study astrocytes, some mentioned in the previous paragraphs [e.g., new transgenic mice, purification methods, and human induced pluripotent stem cells (iPSCs)-derived astrocytes (Almad & Maragakis, 2018; Guttenplan & Liddel, 2019)]. In addition, refined cellular and molecular methods developed in other fields could prove very useful to study reactive astrocytes like spatial transcriptomics (Rodrigues et al., 2019; Wang et al., 2018), scRNAseq (Svensson et al., 2018), Cas9 genome editing and screening (Shalem, Sanjana, & Zhang, 2015), and multiplexed immunostainings (Goltsev et al., 2018). Miniaturization (in terms of quantity of input sample), extension to large brain regions and multiplexing to hundreds or thousands of target genes or proteins will achieve unprecedented resolution to decipher how astrocytes react in a given disease context and define better molecular markers (see Section 6). But in the end, it is the function that matters. How will these molecularly defined reactive astrocytes perform their normal functions? This is easier tested in vitro where several functions can be quickly screened, [e.g., phagocytosis, glutamate uptake, catabolism of specific metabolites, production of cytokines/trophic factors/complement factors, toxicity towards other cell types, and effect on synapses (Diaz-Amarilla et al., 2011; Escartin et al., 2007; Liddel et al., 2017; G. E. Tyzack et al., 2014)]. It may be trickier to explore astrocyte functions in vivo or at least in ex vivo settings like acute brain slices or acutely dissociated astrocytes. It is important to combine functional assessment with some morphological or molecular markers to ascertain that probed astrocytes are indeed reactive and ideally provide some insight into their molecular features. Therefore, methods with cellular resolution like electrophysiology combined with fluorescent detection of markers, multidimensional cytometry, and two-photon imaging with functional sensors are methods of choice to establish how specific types of reactive astrocytes function. Several elegant studies recently succeeded in providing new insight into the complexity of astrocyte functions in the normal brain (Bindocci et al., 2017; Chung et al., 2013; Martin, Bajo-Graneras, Moratalla, Perea, & Araque, 2015; Nimmerjahn & Bergles, 2015) and in disease (Bardehle et al., 2013; Delekate et al., 2014; John Lin et al., 2017; Yu et al., 2018). Future studies will need to implement such refined methods in relevant disease models, to study reactive astrocyte responses at the single-cell level.

Importantly, it is now clear that human astrocytes are more complex than their rodent counterparts and express specific genes (Oberheim et al., 2009; Y. Zhang et al., 2016). In vitro, human and mouse astrocytes are reactive to different stimuli and overexpress different genes [(Tarassishin et al., 2014), Table 3]. It is thus important to eventually go back to human samples to confirm findings obtained in animal models (Arranz & De Strooper, 2019). Patient brains are a valuable resource but with associated bias due to post mortem delay, comorbidities, and other confounding factors. Derivation of human astrocytes from iPSCs taken from patients is opening new research opportunities to probe disease-specific changes (Tyzack, Lakatos, & Patani, 2016). However, the study of reactive astrocytes may be particularly difficult, as iPSC-derived astrocytes (and cultured astrocytes in general) tend to be already reactive, especially when exposed to serum. It is thus required to optimize differentiation and culture protocols to obtain a mature phenotype, reactive to subsequent stimulation (Perriot et al., 2018). It will also be important to define which subtype of reactive astrocytes is modeled and to confirm that this subtype truly exists in vivo.

Research on astrocytes is at an exciting stage, with potent approaches, new models, and refined concepts to study their role in the normal and diseased brain.

14 | CONCLUDING REMARKS

It is now becoming obvious that broad and quite old expressions like *Astrocyte reactivity* or *Astrogliosis* hide in fact a striking complexity with subtle regulations. Our survey highlights that several aspects of astrocyte reaction are still unclear or even controversial, starting with their very name. But, there is a strong interest in better understanding this specific transformation of astrocytes in response to a pathological stimulus. Reactive astrocytes may have significant impact on disease progression, diagnosis, or even treatment. Therefore, we should now aim to disentangle this widespread and complex brain response to disease and define which aspects are amenable to therapeutic improvement.

ACKNOWLEDGMENTS

We are extremely grateful to all researchers who positively replied to our request and provided their own definition of reactive astrocytes. We thank them for their valuable input and support. By alphabetical order: Nicola Allen, Alfonso Araque, Luis Barbeito, Dwight Bergles, Giorgio Carmignoto, Colm Cunningham, Marc Freeman, Elena Galea, Vittorio Gallo, Magdalena Götz, Philip Haydon, Helmut Kettenmann, Schuichi Koizumi, Andras Lakatos, C. Justin Lee, Shane Liddel, Albee Messing, Keith Murai, Christopher Norris, James O'Callaghan, Seiji Okada, Stéphane H. R. Olié, Aude Panatier, Luc Pellerin, Gertrudis Perea, Gabor Petzold, Frank Priege, Stefanie Robel, David Rowitch, Alberto Serrano-Pozo, Svetlana Sirko, Michael Sofroniew, Harald Sontheimer, Christian Steinhauser, Raymond Swanson, Alexei Verkhratsky, and Andrea Volterra. Their full affiliation and reply are provided as Supplemental. We apologize for not being able to cite all



original studies relevant to this review, due to space limitations. We thank Prof. C. Barcia, Dr. E. Hernández-Garzón, Dr. S. Liddel, Prof. M. Sofroniew, Dr. M. Valiente, and Prof. A. Verkhratsky for providing original images for Figure 2. We thank Dr. Lucile Ben Haim for her critical review of the manuscript. Our team is supported by CEA, CNRS, and grants from the French National Research Agency (Grants # 2010-JCJC-1402-1, 2011-BSV4-021-03, and ANR-16-TERC-0016-01), from Fondation Vaincre Alzheimer (Grant # FR-15015), Fédération pour la Recherche sur le Cerveau and Association Huntington France. O.G. is a recipient of a doctoral fellowship from the CEA.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no potential conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.E. wrote the review, performed the survey, and generated Table 1, Table 2, and Figure 3. O.G. generated Table 3. M.A.C.S. produced Figures 1 and 2. All authors edited and finalized the review.

ORCID

Carole Escartin <https://orcid.org/0000-0003-3613-4118>

Maria-Angeles Carrillo-de Sauvage <https://orcid.org/0000-0002-3312-5956>

REFERENCES

- Acáz-Fonseca, E., Duran, J. C., Carrero, P., García-Segura, L. M., & Arevalo, M. A. (2015). Sex differences in glia reactivity after cortical brain injury. *Glia*, 63(11), 1966–1981. <https://doi.org/10.1002/glia.22867>
- Adams, K. L., & Gallo, V. (2018). The diversity and disparity of the glial scar. *Nature Neuroscience*, 21(1), 9–15. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0033-9>
- Aiello, M., Cavaliere, C., Fiorenza, D., Duggento, A., Passamonti, L., & Toschi, N. (2018). Neuroinflammation in neurodegenerative diseases: Current multi-modal imaging studies and future opportunities for hybrid PET/MRI. *Neuroscience*, 403, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.07.033>
- Allaman, I., Gavillet, M., Belanger, M., Laroche, T., Viertl, D., Lashuel, H. A., & Magistretti, P. J. (2010). Amyloid-beta aggregates cause alterations of astrocytic metabolic phenotype: Impact on neuronal viability. *The Journal of Neuroscience*, 30(9), 3326–3338.
- Almad, A., & Maragakis, N. J. (2018). A stocked toolbox for understanding the role of astrocytes in disease. *Nature Reviews Neurology*, 14(6), 351–362. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0010-2>
- Anderson, M. A., Ao, Y., & Sofroniew, M. V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neuroscience Letters*, 565, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.030>
- Anderson, M. A., Burda, J. E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T. M., Kawaguchi, R., ... Sofroniew, M. V. (2016). Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature*, 532(7598), 195–200. <https://doi.org/10.1038/nature17623>
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P. G., Oliet, S. H., Robitaille, R., & Volterra, A. (2014). Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron*, 81(4), 728–739. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.007>
- Arranz, A. M., & De Strooper, B. (2019). The role of astroglia in Alzheimer's disease: Pathophysiology and clinical implications. *Lancet Neurology*, 18(4), 406–414. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30490-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30490-3)
- Barcia, C., Ros, C. M., Annese, V., Gomez, A., Ros-Bernal, F., Aguado-Yera, D., ... Herrero, M. T. (2011). IFN-gamma signaling, with the synergistic contribution of TNF-alpha, mediates cell specific microglial and astroglial activation in experimental models of Parkinson's disease. *Cell Death & Disease*, 2, e142. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.17>
- Barcia, C., Sr., Mitxitorena, I., Carrillo-de Sauvage, M. A., Gallego, J. M., Perez-Valles, A., & Barcia, C., Jr. (2013). Imaging the microanatomy of astrocyte-T-cell interactions in immune-mediated inflammation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 58. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00058>
- Bardehle, S., Kruger, M., Buggenthin, F., Schwausch, J., Ninkovic, J., Clevers, H., ... Gotz, M. (2013). Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. *Nature Neuroscience*, 16(5), 580–586. <https://doi.org/10.1038/nn.3371>
- Bedner, P., Dupper, A., Huttman, K., Muller, J., Herde, M. K., Dublin, P., ... Steinhäuser, C. (2015). Astrocyte uncoupling as a cause of human temporal lobe epilepsy. *Brain*, 138(Pt 5), 1208–1222. <https://doi.org/10.1093/brain/awv067>
- Ben Haim, L., Carrillo-de Sauvage, M. A., Ceyzeriat, K., & Escartin, C. (2015). Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 278. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00278>
- Ben Haim, L., Ceyzeriat, K., Carrillo-de Sauvage, M. A., Aubry, F., Auregan, G., Guillermier, M., ... Escartin, C. (2015). The JAK/STAT3 pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's diseases. *The Journal of Neuroscience*, 35(6), 2817–2829. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3516-14.2015>
- Ben Haim, L., & Rowitch, D. H. (2017). Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(1), 31–41. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.159>
- Benner, E. J., Luciano, D., Jo, R., Abdi, K., Paez-Gonzalez, P., Sheng, H., ... Kuo, C. T. (2013). Protective astrogenesis from the SVZ niche after injury is controlled by notch modulator Thbs4. *Nature*, 497(7449), 369–373. <https://doi.org/10.1038/nature12069>
- Bernardinelli, Y., Randall, J., Janett, E., Nikonenko, I., König, S., Jones, E. V., ... Müller, D. (2014). Activity-dependent structural plasticity of perisynaptic astrocytic domains promotes excitatory synapse stability. *Current Biology*, 24(15), 1679–1688. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.025>
- Beurrier, C., Faideau, M., Bennouar, K. E., Escartin, C., Kerkerian-Le Goff, L., Bonvento, G., & Gubellini, P. (2010). Ciliary neurotrophic factor protects striatal neurons against excitotoxicity by enhancing glial glutamate uptake. *PLoS One*, 5(1), e8550.
- Bhat, R., Crowe, E. P., Bitto, A., Moh, M., Katsetos, C. D., Garcia, F. U., ... Torres, C. (2012). Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 7(9), e45069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045069>
- Biesmans, S., Acton, P. D., Cotto, C., Langlois, X., Ver Donck, L., Bouwknecht, J. A., ... Nuydens, R. (2015). Effect of stress and peripheral immune activation on astrocyte activation in transgenic bioluminescent Gfap-luc mice. *Glia*, 63(7), 1126–1137. <https://doi.org/10.1002/glia.22804>
- Bindocci, E., Savtchouk, I., Liaudet, N., Becker, D., Carriero, G., & Volterra, A. (2017). Three-dimensional Ca²⁺ imaging advances understanding of astrocyte biology. *Science*, 356(6339), eaai8185. <https://doi.org/10.1126/science.aai8185>
- Boisvert, M. M., Erikson, G. A., Shokhiev, M. N., & Allen, N. J. (2018). The aging astrocyte transcriptome from multiple regions of the mouse brain. *Cell Reports*, 22(1), 269–285. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.039>
- Bribian, A., Perez-Cerda, F., Matute, C., & Lopez-Mascaraque, L. (2018). Clonal glial response in a multiple sclerosis mouse model. *Frontiers in*

- Cellular Neuroscience*, 12, 375. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00375>
- Buffo, A., Rite, I., Tripathi, P., Lepier, A., Colak, D., Horn, A. P., ... Gotz, M. (2008). Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(9), 3581–3586.
- Buffo, A., Rolando, C., & Ceruti, S. (2010). Astrocytes in the damaged brain: Molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochemical Pharmacology*, 79(2), 77–89. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.09.014>
- Burbach, G. J., Dehn, D., Del Turco, D., Staufenbiel, M., & Deller, T. (2004). Laser microdissection reveals regional and cellular differences in GFAP mRNA upregulation following brain injury, axonal denervation, and amyloid plaque deposition. *Glia*, 48(1), 76–84. <https://doi.org/10.1002/glia.20057>
- Burda, J. E., Bernstein, A. M., & Sofroniew, M. V. (2016). Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Experimental Neurology*, 275(Pt 3), 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.03.020>
- Bush, T. G., Puvanachandra, N., Horner, C. H., Polito, A., Ostensfeld, T., Svendsen, C. N., ... Sofroniew, M. V. (1999). Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron*, 23(2), 297–308.
- Bussian, T. J., Aziz, A., Meyer, C. F., Swenson, B. L., van Deursen, J. M., & Baker, D. J. (2018). Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature*, 562(7728), 578–582. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0543-y>
- Butt, A. M., & Colquhoun, K. (1996). Glial cells in transected optic nerves of immature rats. I. An analysis of individual cells by intracellular dye-injection. *Journal of Neurocytology*, 25(6), 365–380.
- Carrillo-de Sauvage, M. A., Flament, J., Bramoulle, Y., Ben Haim, L., Guillemier, M., Berniard, A., ... Escartin, C. (2015). The neuroprotective agent CNTF decreases neuronal metabolites in the rat striatum: An in vivo multimodal magnetic resonance imaging study. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35(6), 917–921. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.48>
- Carter, S. F., Herholz, K., Rosa-Neto, P., Pellerin, L., Nordberg, A., & Zimmer, E. R. (2019). Astrocyte biomarkers in Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine*, 25(2), 77–95. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.11.006>
- Cassina, P., Cassina, A., Pehar, M., Castellanos, R., Gandelman, M., de Leon, A., ... Radi, R. (2008). Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: Prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *The Journal of Neuroscience*, 28(16), 4115–4122. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5308-07.2008>
- Ceyzériat, K., Abjean, L., Carrillo-de Sauvage, M. A., Ben Haim, L., & Escartin, C. (2016). The complex STATES of astrocyte reactivity: How are they controlled by the JAK-STAT3 pathway? *Neuroscience*, 330, 205–218. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.043>
- Ceyzériat, K., Ben Haim, L., Denizot, A., Pommier, D., Matos, M., Guillemaud, O., ... Escartin, C. (2018). Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0606-1>
- Chai, H., Diaz-Castro, B., Shigetomi, E., Monte, E., Oceau, J. C., Yu, X., ... Khakh, B. S. (2017). Neural circuit-specialized astrocytes: Transcriptomic, proteomic, morphological, and functional evidence. *Neuron*, 95(3), 531.e9–549.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.029>
- Charron, G., Doudnikoff, E., Canron, M. H., Li, Q., Vega, C., Marais, S., ... Bezard, E. (2014). Astrocytosis in parkinsonism: Considering tripartite striatal synapses in physiopathology? *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, 258. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00258>
- Chaslin, P. (1891). Contribution à l'étude de la sclérose cérébrale. In M. Charcot (Ed.), *Archives de médecine expérimentale et d'anatomie pathologique*. Paris: G. Masson, 3, 305–340.
- Chou, S. Y., Weng, J. Y., Lai, H. L., Liao, F., Sun, S. H., Tu, P. H., ... Chern, Y. (2008). Expanded-polyglutamine Huntingtin protein suppresses the secretion and production of a chemokine (CCL5/RANTES) by astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 28(13), 3277–3290. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0116-08.2008>
- Chun, H., An, H., Lim, J., Woo, J., Lee, J., Ryu, H., & Lee, C. J. (2018). Astrocytic proBDNF and tonic GABA distinguish active versus reactive astrocytes in hippocampus. *Experimental Neurobiology*, 27(3), 155–170. <https://doi.org/10.5607/en.2018.27.3.155>
- Chun, H., & Lee, C. J. (2018). Reactive astrocytes in Alzheimer's disease: A double-edged sword. *Neuroscience Research*, 126, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.11.012>
- Chung, W. S., Clarke, L. E., Wang, G. X., Stafford, B. K., Sher, A., Chakraborty, C., ... Barres, B. A. (2013). Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature*, 504(7480), 394–400. <https://doi.org/10.1038/nature12776>
- Clarke, L. E., Liddelow, S. A., Chakraborty, C., Munch, A. E., Heiman, M., & Barres, B. A. (2018). Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(8), E1896–E1905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800165115>
- Clasadonte, J., Morel, L., Barrios-Camacho, C. M., Chiang, M. S., Zhang, J., Iyer, L., ... Yang, Y. (2016). Molecular analysis of acute and chronic reactive astrocytes in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease*, 91, 315–325. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.03.024>
- Cordeau, P., Jr., Lalancette-Hebert, M., Weng, Y. C., & Kriz, J. (2008). Live imaging of neuroinflammation reveals sex and estrogen effects on astrocyte response to ischemic injury. *Stroke*, 39(3), 935–942.
- Coulter, D. A., & Steinhäuser, C. (2015). Role of astrocytes in epilepsy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(3), a022434. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022434>
- Cunningham, C., Dunne, A., & Lopez-Rodriguez, A. B. (2018). Astrocytes: Heterogeneous and dynamic phenotypes in neurodegeneration and innate immunity. *The Neuroscientist*. <https://doi.org/10.1177/1073858418809941>
- Delekate, A., Fuchtemeier, M., Schumacher, T., Ulbrich, C., Foddiss, M., & Petzold, G. C. (2014). Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. *Nature Communications*, 5, 5422. <https://doi.org/10.1038/ncomms6422>
- Diaz-Amarilla, P., Olivera-Bravo, S., Trias, E., Cragolini, A., Martinez-Palma, L., Cassina, P., ... Barbeito, L. (2011). Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(44), 18126–18131. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110689108>
- Escartin, C., Brouillet, E., Gubellini, P., Trioulier, Y., Jacquard, C., Smadja, C., ... Bonvento, G. (2006). Ciliary neurotrophic factor activates astrocytes, redistributes their glutamate transporters GLAST and GLT-1 to raft microdomains, and improves glutamate handling in vivo. *The Journal of Neuroscience*, 26(22), 5978–5989.
- Escartin, C., Pierre, K., Colin, A., Brouillet, E., Delzescaux, T., Guillemier, M., ... Bonvento, G. (2007). Activation of astrocytes by CNTF induces metabolic plasticity and increases resistance to metabolic insults. *The Journal of Neuroscience*, 27(27), 7094–7104.
- Escartin, C., & Rouach, N. (2013). Astroglial networking contributes to neurometabolic coupling. *Frontiers in Neuroenergetics*, 5, 4. <https://doi.org/10.3389/fnene.2013.00004>
- Faideau, M., Kim, J., Cormier, K., Gilmore, R., Welch, M., Auregan, G., ... Bonvento, G. (2010). In vivo expression of polyglutamine-expanded huntingtin by mouse striatal astrocytes impairs glutamate transport: A

- correlation with Huntington's disease subjects. *Human Molecular Genetics*, 19(15), 3053–3067. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq212>
- Faiz, M., Sachewsky, N., Gascon, S., Bang, K. W., Morshead, C. M., & Nagy, A. (2015). Adult neural stem cells from the subventricular zone give rise to reactive astrocytes in the cortex after stroke. *Cell Stem Cell*, 17(5), 624–634. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.08.002>
- Faulkner, J. R., Herrmann, J. E., Woo, M. J., Tansey, K. E., Doan, N. B., & Sofroniew, M. V. (2004). Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience*, 24(9), 2143–2155.
- Frik, J., Merl-Pham, J., Plesnila, N., Mattugini, N., Kjell, J., Kraska, J., ... Gotz, M. (2018). Cross-talk between monocyte invasion and astrocyte proliferation regulates scarring in brain injury. *EMBO Reports*, 19(5), e45294. <https://doi.org/10.15252/embr.201745294>
- Garcia, A. D., Petrova, R., Eng, L., & Joyner, A. L. (2010). Sonic hedgehog regulates discrete populations of astrocytes in the adult mouse forebrain. *The Journal of Neuroscience*, 30(41), 13597–13608. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0830-10.2010>
- Gavillet, M., Allaman, I., & Magistretti, P. J. (2008). Modulation of astrocytic metabolic phenotype by proinflammatory cytokines. *Glia*, 56(9), 975–989.
- Gibson, E. M., Nagaraja, S., Ocampo, A., Tam, L. T., Wood, L. S., Pallegar, P. N., ... Monje, M. (2019). Methotrexate chemotherapy induces persistent tri-glial dysregulation that underlies chemotherapy-related cognitive impairment. *Cell*, 176(1–2), 43.e13–55.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.049>
- Giffard, R. G., & Swanson, R. A. (2005). Ischemia-induced programmed cell death in astrocytes. *Glia*, 50(4), 299–306.
- Goltsev, Y., Samusik, N., Kennedy-Darling, J., Bhate, S., Hale, M., Vazquez, G., ... Nolan, G. P. (2018). Deep profiling of mouse splenic architecture with CODEX multiplexed imaging. *Cell*, 174(4), 968–981.e915. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.010>
- Gomez-Arboledas, A., Davila, J. C., Sanchez-Mejias, E., Navarro, V., Nunez-Diaz, C., Sanchez-Varo, R., ... Gutierrez, A. (2018). Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease. *Glia*, 66(3), 637–653. <https://doi.org/10.1002/glia.23270>
- Gotz, M., Sirko, S., Beckers, J., & Irmeler, M. (2015). Reactive astrocytes as neural stem or progenitor cells: in vivo lineage, in vitro potential, and genome-wide expression analysis. *Glia*, 63(8), 1452–1468. <https://doi.org/10.1002/glia.22850>
- Griemsmann, S., Hoft, S. P., Bedner, P., Zhang, J., von Staden, E., Beinhauer, A., ... Steinhauser, C. (2015). Characterization of Panglial gap junction networks in the thalamus, neocortex, and hippocampus reveals a unique population of glial cells. *Cerebral Cortex*, 25(10), 3420–3433. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu157>
- Guttenplan, K. A., & Liddel, S. A. (2019). Astrocytes and microglia: Models and tools. *The Journal of Experimental Medicine*, 216(1), 71–83. <https://doi.org/10.1084/jem.20180200>
- Habib, N., Avraham-David, I., Basu, A., Burks, T., Shekhar, K., Hofree, M., ... Regev, A. (2017). Massively parallel single-nucleus RNA-seq with DroNc-seq. *Nature Methods*, 14(10), 955–958. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4407>
- Haidet-Phillips, A. M., Hester, M. E., Miranda, C. J., Meyer, K., Braun, L., Frakes, A., ... Kaspar, B. K. (2011). Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nature Biotechnology*, 29(9), 824–828. <https://doi.org/10.1038/nbt.1957>
- Halford, J., Shen, S., Itamura, K., Levine, J., Chong, A. C., Czerwieniec, G., ... Wanner, I. B. (2017). New astroglial injury-defined biomarkers for neurotrauma assessment. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 37(10), 3278–3299. <https://doi.org/10.1177/0271678X17724681>
- Hammond, T. R., Dufort, C., Dissing-Olesen, L., Giera, S., Young, A., Wysoker, A., ... Stevens, B. (2018). Single-cell RNA sequencing of microglia throughout the mouse lifespan and in the injured brain reveals complex cell-state changes. *Immunity*, 50(1), 253.e6–271.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.11.004>
- Hara, M., Kobayakawa, K., Ohkawa, Y., Kumamaru, H., Yokota, K., Saito, T., ... Okada, S. (2017). Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury. *Nature Medicine*, 23(7), 818–828. <https://doi.org/10.1038/nm.4354>
- Hennessy, E., Griffin, E. W., & Cunningham, C. (2015). Astrocytes are primed by chronic neurodegeneration to produce exaggerated chemokine and cell infiltration responses to acute stimulation with the cytokines IL-1 β and TNF- α . *The Journal of Neuroscience*, 35(22), 8411–8422. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2745-14.2015>
- Herrmann, J. E., Imura, T., Song, B., Qi, J., Ao, Y., Nguyen, T. K., ... Sofroniew, M. V. (2008). STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience*, 28(28), 7231–7243.
- Hill, S. J., Barbarese, E., & McIntosh, T. K. (1996). Regional heterogeneity in the response of astrocytes following traumatic brain injury in the adult rat. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 55(12), 1221–1229.
- Hoke, A., Canning, D. R., Malesmud, C. J., & Silver, J. (1994). Regional differences in reactive gliosis induced by substrate-bound beta-amyloid. *Experimental Neurology*, 130(1), 56–66. <https://doi.org/10.1006/exnr.1994.1185>
- Hol, E. M., & Pekny, M. (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology*, 32, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.ccb.2015.02.004>
- Hristova, M., Rocha-Ferreira, E., Fontana, X., Thei, L., Buckle, R., Christou, M., ... Peebles, D. (2016). Inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) reduces neonatal hypoxic-ischaemic brain damage. *Journal of Neurochemistry*, 136(5), 981–994. <https://doi.org/10.1111/jnc.13490>
- Ito, M., Komai, K., Mise-Omata, S., Iizuka-Koga, M., Noguchi, Y., Kondo, T., ... Yoshimura, A. (2019). Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery. *Nature*, 565(7738), 246–250. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0824-5>
- Itoh, N., Itoh, Y., Tassoni, A., Ren, E., Kaito, M., Ohno, A., ... Voskuhl, R. R. (2018). Cell-specific and region-specific transcriptomics in the multiple sclerosis model: Focus on astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(2), E302–E309. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716032115>
- Jenab, S., & Quinones-Jenab, V. (2002). The effects of interleukin-6, leukemia inhibitory factor and interferon-gamma on STAT DNA binding and c-fos mRNA levels in cortical astrocytes and C6 glioma cells. *Neuro Endocrinology Letters*, 23(4), 325–328.
- Jo, S., Yarishkin, O., Hwang, Y. J., Chun, Y. E., Park, M., Woo, D. H., ... Lee, C. J. (2014). GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 20(8), 886–896. <https://doi.org/10.1038/nm.3639>
- John Lin, C. C., Yu, K., Hatcher, A., Huang, T. W., Lee, H. K., Carlson, J., ... Deneen, B. (2017). Identification of diverse astrocyte populations and their malignant analogs. *Nature Neuroscience*, 20(3), 396–405. <https://doi.org/10.1038/nn.4493>
- Kaneko, N., Herranz-Perez, V., Otsuka, T., Sano, H., Ohno, N., Omata, T., ... Sawamoto, K. (2018). New neurons use slit-Robo signaling to migrate through the glial meshwork and approach a lesion for functional regeneration. *Science Advances*, 4(12), eaav0618. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav0618>
- Kanamaru, K., Kubota, J., Sekiya, H., Hirose, K., Okubo, Y., & Iino, M. (2013). Calcium-dependent N-cadherin up-regulation mediates reactive astrogliosis and neuroprotection after brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(28), 11612–11617. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300378110>
- Kang, W., Balordi, F., Su, N., Chen, L., Fishell, G., & Hebert, J. M. (2014). Astrocyte activation is suppressed in both normal and injured brain by FGF signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America, 111(29), E2987–E2995. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320401111>
- Kang, W., & Hebert, J. M. (2011). Signaling pathways in reactive astrocytes, a genetic perspective. *Molecular Neurobiology*, 43(3), 147–154. <https://doi.org/10.1007/s12035-011-8163-7>
- Kelley, K. W., Nakao-Inoue, H., Molofsky, A. V., & Oldham, M. C. (2018). Variation among intact tissue samples reveals the core transcriptional features of human CNS cell classes. *Nature Neuroscience*, 21(9), 1171–1184. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0216-z>
- Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T. K., ... Amit, I. (2017). A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease. *Cell*, 169(7), 1276.e17–1290.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.018>
- Khakh, B. S., Beaumont, V., Cachope, R., Munoz-Sanjuan, I., Goldman, S. A., & Grantyn, R. (2017). Unravelling and exploiting astrocyte dysfunction in Huntington's disease. *Trends in Neurosciences*, 40(7), 422–437. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.05.002>
- Kim, W. R., Kim, J. Y., Moon, Y., Kim, H. J., Kim, H., & Sun, W. (2012). Regional difference of reactive astrogliosis following traumatic brain injury revealed by hGFAP-GFP transgenic mice. *Neuroscience Letters*, 513(2), 155–159. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.02.023>
- Kremer, M. C., Jung, C., Batelli, S., Rubin, G. M., & Gaul, U. (2017). The glia of the adult Drosophila nervous system. *Glia*, 65(4), 606–638. <https://doi.org/10.1002/glia.23115>
- Lanjakornsiripan, D., Pior, B. J., Kawaguchi, D., Furutachi, S., Tahara, T., Katsuyama, Y., ... Gotoh, Y. (2018). Layer-specific morphological and molecular differences in neocortical astrocytes and their dependence on neuronal layers. *Nature Communications*, 9(1), 1623. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03940-3>
- Lattke, M., Reichel, S. N., Magnutzki, A., Abaei, A., Rasche, V., Walther, P., ... Baumann, B. (2017). Transient IKK2 activation in astrocytes initiates selective non-cell-autonomous neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0157-0>
- Lavis, S., Guillemer, M., Herard, A. S., Petit, F., Delahaye, M., Van Camp, N., ... Escartin, C. (2012). Reactive astrocytes overexpress TSPO and are detected by TSPO positron emission tomography imaging. *The Journal of Neuroscience*, 32(32), 10809–10818.
- LeComte, M. D., Shimada, I. S., Sherwin, C., & Spees, J. L. (2015). Notch1-STAT3-ETBR signaling axis controls reactive astrocyte proliferation after brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(28), 8726–8731. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501029112>
- Lei, W., Li, W., Ge, L., & Chen, G. (2019). Non-engineered and engineered adult neurogenesis in mammalian brains. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 131. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00131>
- Lian, H., Yang, L., Cole, A., Sun, L., Chiang, A. C., Fowler, S. W., ... Zheng, H. (2015). NF- κ B-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease. *Neuron*, 85(1), 101–115. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.11.018>
- Lichter-Konecki, U., Mangin, J. M., Gordish-Dressman, H., Hoffman, E. P., & Gallo, V. (2008). Gene expression profiling of astrocytes from hyperammonemic mice reveals altered pathways for water and potassium homeostasis in vivo. *Glia*, 56(4), 365–377. <https://doi.org/10.1002/glia.20624>
- Liddelow, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive astrocytes: Production, function, and therapeutic potential. *Immunity*, 46(6), 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>
- Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Ligneul, C., Palombo, M., Hernandez-Garzon, E., Carrillo-de Sauvage, M. A., Flament, J., Hantraye, P., ... Valette, J. (2019). Diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy enables cell-specific monitoring of astrocyte reactivity in vivo. *NeuroImage*, 191, 457–469. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.02.046>
- Litvinchuk, A., Wan, Y. W., Swartzlander, D. B., Chen, F., Cole, A., Propson, N. E., ... Zheng, H. (2018). Complement C3aR inactivation attenuates tau pathology and reverses an immune network deregulated in tauopathy models and Alzheimer's disease. *Neuron*, 100(6), 1337–1353.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.031>
- Locatelli, G., Theodorou, D., Kendirli, A., Jordao, M. J. C., Staszewski, O., Phulphagar, K., ... Kerschensteiner, M. (2018). Mononuclear phagocytes locally specify and adapt their phenotype in a multiple sclerosis model. *Nature Neuroscience*, 21(9), 1196–1208. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0212-3>
- Lu, T. Y., MacDonald, J. M., Neukomm, L. J., Sheehan, A. E., Bradshaw, R., Logan, M. A., & Freeman, M. R. (2017). Axon degeneration induces glial responses through Draper-TRAF4-JNK signalling. *Nature Communications*, 8, 14355. <https://doi.org/10.1038/ncomms14355>
- Lukaszevicz, A. C., Sampaio, N., Guegan, C., Benchoua, A., Couriaud, C., Chevalier, E., ... Onteniente, B. (2002). High sensitivity of protoplasmic cortical astroglia to focal ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 22(3), 289–298. <https://doi.org/10.1097/00004647-200203000-00006>
- Macosko, E. Z., Basu, A., Satija, R., Nemesh, J., Shekhar, K., Goldman, M., ... McCarroll, S. A. (2015). Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using Nanoliter droplets. *Cell*, 161(5), 1202–1214. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.002>
- Magnusson, J. P., Goritz, C., Tatarishvili, J., Dias, D. O., Smith, E. M., Lindvall, O., ... Frisen, J. (2014). A latent neurogenic program in astrocytes regulated by notch signaling in the mouse. *Science*, 346(6206), 237–241. <https://doi.org/10.1126/science.1246206>
- Martin, R., Bajo-Graneras, R., Moratalla, R., Perea, G., & Araque, A. (2015). Circuit-specific signaling in astrocyte-neuron networks in basal ganglia pathways. *Science*, 349(6249), 730–734. <https://doi.org/10.1126/science.1267945>
- Martin-Lopez, E., Garcia-Marques, J., Nunez-Llaves, R., & Lopez-Mascaraque, L. (2013). Clonal astrocytic response to cortical injury. *PLoS One*, 8(9), e74039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074039>
- Masuda, T., Sankowski, R., Staszewski, O., Bottcher, C., Amann, L., Scheiwe, C., ... Prinz, M. (2019). Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution. *Nature*, 566(7744), 388–392. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0924-x>
- Mattugini, N., Merl-Pham, J., Petrozziello, E., Schindler, L., Bernhagen, J., Hauck, S. M., & Gotz, M. (2018). Influence of white matter injury on gray matter reactive gliosis upon stab wound in the adult murine cerebral cortex. *Glia*, 66(8), 1644–1662. <https://doi.org/10.1002/glia.23329>
- Messing, A. (2018). Alexander disease. *Handbook of Clinical Neurology*, 148, 693–700. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64076-5.00044-2>
- Mishra, A. (2017). Binaural blood flow control by astrocytes: Listening to synapses and the vasculature. *The Journal of Physiology*, 595(6), 1885–1902. <https://doi.org/10.1113/JP270979>
- Moeendarbary, E., Weber, I. P., Sheridan, G. K., Koser, D. E., Soleman, S., Haenzi, B., ... Franze, K. (2017). The soft mechanical signature of glial scars in the central nervous system. *Nature Communications*, 8, 14787. <https://doi.org/10.1038/ncomms14787>
- Morel, L., Chiang, M. S. R., Higashimori, H., Shoneye, T., Iyer, L. K., Yelick, J., ... Yang, Y. (2017). Molecular and functional properties of regional astrocytes in the adult brain. *The Journal of Neuroscience*, 37(36), 8706–8717. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3956-16.2017>
- Morizawa, Y. M., Hirayama, Y., Ohno, N., Shibata, S., Shigetomi, E., Sui, Y., ... Koizumi, S. (2017). Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. *Nature Communications*, 8(1), 28. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00037-1>
- Moshayedi, P., Ng, G., Kwok, J. C., Yeo, G. S., Bryant, C. E., Fawcett, J. W., ... Guck, J. (2014). The relationship between glial cell mechanosensitivity

- and foreign body reactions in the central nervous system. *Biomaterials*, 35(13), 3919–3925. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.01.038>
- Munger, E. L., Edler, M. K., Hopkins, W. D., Ely, J. J., Erwin, J. M., Perl, D. P., ... Raghanti, M. A. (2019). Astrocytic changes with aging and Alzheimer's disease-type pathology in chimpanzees. *The Journal of Comparative Neurology*, 527(7), 1179–1195. <https://doi.org/10.1002/cne.24610>
- Nagai, M., Re, D. B., Nagata, T., Chalazonitis, A., Jessell, T. M., Wichterle, H., & Przedborski, S. (2007). Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nature Neuroscience*, 10(5), 615–622.
- Nagy, J. I., Li, W., Hertzberg, E. L., & Marotta, C. A. (1996). Elevated connexin43 immunoreactivity at sites of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Brain Research*, 717(1–2), 173–178.
- Neal, M., & Richardson, J. R. (2018). Epigenetic regulation of astrocyte function in neuroinflammation and neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1864(2), 432–443. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2017.11.004>
- Nimmerjahn, A., & Bergles, D. E. (2015). Large-scale recording of astrocyte activity. *Current Opinion in Neurobiology*, 32, 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.01.015>
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308(5726), 1314–1318.
- Nobuta, H., Ghiani, C. A., Paez, P. M., Spreuer, V., Dong, H., Korsak, R. A., ... Waschek, J. A. (2012). STAT3-mediated astrogliosis protects myelin development in neonatal brain injury. *Annals of Neurology*, 72(5), 750–765. <https://doi.org/10.1002/ana.23670>
- Norden, D. M., Trojanowski, P. J., Villanueva, E., Navarro, E., & Godbout, J. P. (2016). Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia*, 64(2), 300–316. <https://doi.org/10.1002/glia.22930>
- Nwaobi, S. E., Cuddapah, V. A., Patterson, K. C., Randolph, A. C., & Olsen, M. L. (2016). The role of glial-specific Kir4.1 in normal and pathological states of the CNS. *Acta Neuropathologica*, 132(1), 1–21. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1553-1>
- Oberheim, N. A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J. H., Wang, F., ... Nedergaard, M. (2009). Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 29(10), 3276–3287. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4707-08.2009>
- Oberheim, N. A., Tian, G. F., Han, X., Peng, W., Takano, T., Ransom, B., & Nedergaard, M. (2008). Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain. *The Journal of Neuroscience*, 28(13), 3264–3276.
- O'Callaghan, J. P., Kelly, K. A., VanGilder, R. L., Sofroniew, M. V., & Miller, D. B. (2014). Early activation of STAT3 regulates reactive astrogliosis induced by diverse forms of neurotoxicity. *PLoS One*, 9(7), e102003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102003>
- Oeckl, P., Lattke, M., Wirth, T., Baumann, B., & Ferger, B. (2012). Astrocyte-specific IKK2 activation in mice is sufficient to induce neuroinflammation but does not increase susceptibility to MPTP. *Neurobiology of Disease*, 48(3), 481–487. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.06.010>
- Okada, S., Nakamura, M., Katoh, H., Miyao, T., Shimazaki, T., Ishii, K., ... Okano, H. (2006). Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nature Medicine*, 12(7), 829–834.
- Olabarria, M., Noristani, H. N., Verkhratsky, A., & Rodriguez, J. J. (2010). Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia*, 58(7), 831–838.
- Orre, M., Kamphuis, W., Osborn, L. M., Jansen, A. H., Kooijman, L., Bossers, K., & Hol, E. M. (2014). Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiology of Aging*, 35(12), 2746–2760. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.06.004>
- Orre, M., Kamphuis, W., Osborn, L. M., Melief, J., Kooijman, L., Huitinga, I., ... Hol, E. M. (2014). Acute isolation and transcriptome characterization of cortical astrocytes and microglia from young and aged mice. *Neurobiology of Aging*, 35(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.07.008>
- Ortinski, P. I., Dong, J., Mungenast, A., Yue, C., Takano, H., Watson, D. J., ... Coulter, D. A. (2010). Selective induction of astrocytic gliosis generates deficits in neuronal inhibition. *Nature Neuroscience*, 13(5), 584–591.
- Osborn, L. M., Kamphuis, W., Wadman, W. J., & Hol, E. M. (2016). Astrogliosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, 144, 121–141. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.01.001>
- Ouali Alami, N., Schurr, C., Olde Heuvel, F., Tang, L., Li, Q., Tasdogan, A., ... Baumann, B. (2018). NF-kappaB activation in astrocytes drives a stage-specific beneficial neuroimmunological response in ALS. *The EMBO Journal*, 37(16), e98697. <https://doi.org/10.15252/embj.201798697>
- Pannasch, U., & Rouach, N. (2013). Emerging role for astroglial networks in information processing: From synapse to behavior. *Trends in Neurosciences*, 36(7), 405–417. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.04.004>
- Pekny, M., Pekna, M., Messing, A., Steinhauser, C., Lee, J. M., Pappas, V., ... Verkhratsky, A. (2016). Astrocytes: A central element in neurological diseases. *Acta Neuropathologica*, 131(3), 323–345. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1513-1>
- Pekny, M., Wilhelmsson, U., Tatlisumak, T., & Pekna, M. (2019). Astrocyte activation and reactive gliosis-A new target in stroke? *Neuroscience Letters*, 689, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.07.021>
- Perez-Nievas, B. G., & Serrano-Pozo, A. (2018). Deciphering the astrocyte reaction in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 114. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00114>
- Perriot, S., Mathias, A., Perriard, G., Canales, M., Jonkmans, N., Merienne, N., ... Du Pasquier, R. (2018). Human induced pluripotent stem cell-derived astrocytes are differentially activated by multiple sclerosis-associated cytokines. *Stem Cell Reports*, 11(5), 1199–1210. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.09.015>
- Pike, C. J., Cummings, B. J., & Cotman, C. W. (1995). Early association of reactive astrocytes with senile plaques in Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*, 132(2), 172–179.
- Pollen, A. A., Nowakowski, T. J., Shuga, J., Wang, X., Leyrat, A. A., Lui, J. H., ... West, J. A. (2014). Low-coverage single-cell mRNA sequencing reveals cellular heterogeneity and activated signaling pathways in developing cerebral cortex. *Nature Biotechnology*, 32(10), 1053–1058. <https://doi.org/10.1038/nbt.2967>
- Ponath, G., Ramanan, S., Mubarak, M., Housley, W., Lee, S., Sahinkaya, F. R., ... Pitt, D. (2017). Myelin phagocytosis by astrocytes after myelin damage promotes lesion pathology. *Brain*, 140(2), 399–413. <https://doi.org/10.1093/brain/aww298>
- Poskanzer, K. E., & Molofsky, A. V. (2018). Dynamism of an astrocyte in vivo: Perspectives on identity and function. *Annual Review of Physiology*, 80, 143–157. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317-121125>
- Priego, N., Zhu, L., Monteiro, C., Mulders, M., Wasilewski, D., Bindeman, W., ... Valiente, M. (2018). STAT3 labels a subpopulation of reactive astrocytes required for brain metastasis. *Nature Medicine*, 24(7), 1024–1035. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0044-4>
- Priller, J., Reddington, M., Haas, C. A., & Kreutzberg, G. W. (1998). Stimulation of P2Y-purinoreceptors on astrocytes results in immediate early gene expression and potentiation of neuropeptide action. *Neuroscience*, 85(2), 521–525.
- Ramón y Cajal, S. (1925). Contribution à la connaissance de la névroglie cérébrale et cérébelleuse dans la paralysie générale progressive. *Trabajos del Instituto Cajal de Investigaciones Biológicas*, 23, 157–216.
- Reichenbach, N., Delekate, A., Plescher, M., Schmitt, F., Krauss, S., Blank, N., ... Petzold, G. C. (2019). Inhibition of Stat3-mediated astrogliosis ameliorates pathology in an Alzheimer's disease model. *EMBO Molecular Medicine*, 11, e9665. <https://doi.org/10.15252/emmm.201809665>

- Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T. M., Burda, J. E., Bernstein, A. M., Brumm, A. J., ... Sofroniew, M. V. (2017). Ependymal cell contribution to scar formation after spinal cord injury is minimal, local and dependent on direct ependymal injury. *Scientific Reports*, 7, 41122. <https://doi.org/10.1038/srep41122>
- Robel, S., Bardehle, S., Lepier, A., Brakebusch, C., & Gotz, M. (2011). Genetic deletion of *cdc42* reveals a crucial role for astrocyte recruitment to the injury site in vitro and in vivo. *The Journal of Neuroscience*, 31(35), 12471–12482. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2696-11.2011>
- Robel, S., Mori, T., Zoubaa, S., Schlegel, J., Sirko, S., Faissner, A., ... Gotz, M. (2009). Conditional deletion of *beta1-integrin* in astroglia causes partial reactive gliosis. *Glia*, 57(15), 1630–1647. <https://doi.org/10.1002/glia.20876>
- Robel, S., & Sontheimer, H. (2016). Glia as drivers of abnormal neuronal activity. *Nature Neuroscience*, 19(1), 28–33. <https://doi.org/10.1038/nn.4184>
- Rodriguez-Vieitez, E., Saint-Aubert, L., Carter, S. F., Almkvist, O., Farid, K., Scholl, M., ... Nordberg, A. (2016). Diverging longitudinal changes in astrocytosis and amyloid PET in autosomal dominant Alzheimer's disease. *Brain*, 139(Pt 3), 922–936. <https://doi.org/10.1093/brain/awv404>
- Rodrigues, S. G., Stickels, R. R., Goeva, A., Martin, C. A., Murray, E., Vanderburg, C. R., ... Macosko, E. Z. (2019). Slide-seq: A scalable technology for measuring genome-wide expression at high spatial resolution. *Science*, 363(6434), 1463–1467. <https://doi.org/10.1126/science.aaw1219>
- Rossi, D., Brambilla, L., Valori, C. F., Roncoroni, C., Crugnola, A., Yokota, T., ... Volterra, A. (2008). Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death and Differentiation*, 15(11), 1691–1700. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.99>
- Rothhammer, V., Borucki, D. M., Tjon, E. C., Takenaka, M. C., Chao, C. C., Ardura-Fabregat, A., ... Quintana, F. J. (2018). Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature*, 557(7707), 724–728. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0119-x>
- Rothhammer, V., Maccanfroni, I. D., Bunse, L., Takenaka, M. C., Kenison, J. E., Mayo, L., ... Quintana, F. J. (2016). Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nature Medicine*, 22(6), 586–597. <https://doi.org/10.1038/nm.4106>
- Sabelstrom, H., Stenudd, M., & Frisen, J. (2014). Neural stem cells in the adult spinal cord. *Experimental Neurology*, 260, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.01.026>
- Sabelstrom, H., Stenudd, M., Reu, P., Dias, D. O., Elfineh, M., Zdunek, S., ... Frisen, J. (2013). Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice. *Science*, 342(6158), 637–640. <https://doi.org/10.1126/science.1242576>
- Salminen, A., Ojala, J., Kaarniranta, K., Haapasalo, A., Hiltunen, M., & Soininen, H. (2011). Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. *The European Journal of Neuroscience*, 34(1), 3–11. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07738.x>
- Schiweck, J., Eickholt, B. J., & Murk, K. (2018). Important shapeshifter: Mechanisms allowing astrocytes to respond to the changing nervous system during development, injury and disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 261. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00261>
- Scholl, M., Carter, S. F., Westman, E., Rodriguez-Vieitez, E., Almkvist, O., Thordardottir, S., ... Nordberg, A. (2015). Early astrocytosis in autosomal dominant Alzheimer's disease measured in vivo by multi-tracer positron emission tomography. *Scientific Reports*, 5, 16404. <https://doi.org/10.1038/srep16404>
- Sekar, S., McDonald, J., Cuyugan, L., Aldrich, J., Kurdoglu, A., Adkins, J., ... Liang, W. S. (2015). Alzheimer's disease is associated with altered expression of genes involved in immune response and mitochondrial processes in astrocytes. *Neurobiology of Aging*, 36(2), 583–591. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.027>
- Selkoe, D. J., Salazar, F. J., Abraham, C., & Kosik, K. S. (1982). Huntington's disease: Changes in striatal proteins reflect astrocytic gliosis. *Brain Research*, 245(1), 117–125.
- Serrano-Perez, M. C., Martin, E. D., Vaquero, C. F., Azcoitia, I., Calvo, S., Cano, E., & Tranque, P. (2011). Response of transcription factor NFATc3 to excitotoxic and traumatic brain insults: Identification of a subpopulation of reactive astrocytes. *Glia*, 59(1), 94–107. <https://doi.org/10.1002/glia.21079>
- Shalem, O., Sanjana, N. E., & Zhang, F. (2015). High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nature Reviews. Genetics*, 16(5), 299–311. <https://doi.org/10.1038/nrg3899>
- Shandra, O., Winemiller, A. R., Heithoff, B. P., Munoz-Ballester, C., George, K. K., Benko, M. J., ... Robel, S. (2019). Repetitive diffuse mild traumatic brain injury causes an atypical astrocyte response and spontaneous recurrent seizures. *The Journal of Neuroscience*, 39(10), 1944–1963. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1067-18.2018>
- Sheldon, A. L., & Robinson, M. B. (2007). The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochemistry International*, 51(6–7), 333–355. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.03.012>
- Shinozaki, Y., Shibata, K., Yoshida, K., Shigetomi, E., Gachet, C., Ikenaka, K., ... Koizumi, S. (2017). Transformation of astrocytes to a neuroprotective phenotype by microglia via P2Y1 receptor downregulation. *Cell Reports*, 19(6), 1151–1164. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.047>
- Shiow, L. R., Favrais, G., Schirmer, L., Schang, A. L., Cipriani, S., Andres, C., ... Rowitch, D. H. (2017). Reactive astrocyte COX2-PGE2 production inhibits oligodendrocyte maturation in neonatal white matter injury. *Glia*, 65(12), 2024–2037. <https://doi.org/10.1002/glia.23212>
- Silver, J. (2016). The glial scar is more than just astrocytes. *Experimental Neurology*, 286, 147–149. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.06.018>
- Sirko, S., Behrendt, G., Johansson, P. A., Tripathi, P., Costa, M., Bek, S., ... Gotz, M. (2013). Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog glia. *Cell Stem Cell*, 12(4), 426–439. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.01.019>
- Sirko, S., Irmeler, M., Gascon, S., Bek, S., Schneider, S., Dimou, L., ... Gotz, M. (2015). Astrocyte reactivity after brain injury: The role of galectins 1 and 3. *Glia*, 63(12), 2340–2361. <https://doi.org/10.1002/glia.22898>
- Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*, 32(12), 638–647.
- Sofroniew, M. V. (2014a). Astrogliosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(2), a020420. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020420>
- Sofroniew, M. V. (2014b). Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators. *The Neuroscientist*, 20(2), 160–172. <https://doi.org/10.1177/1073858413504466>
- Sofroniew, M. V. (2018). Dissecting spinal cord regeneration. *Nature*, 557(7705), 343–350. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0068-4>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7–35.
- Sompol, P., & Norris, C. M. (2018). Ca(2+), astrocyte activation and calcineurin/NFAT signaling in age-related neurodegenerative diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 199. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00199>
- Song, W. M., & Colonna, M. (2018). The identity and function of microglia in neurodegeneration. *Nature Immunology*, 19(10), 1048–1058. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0212-1>
- Soreq, L., UK Brain Expression Consortium, North American Brain Expression Consortium, Rose, J., Soreq, E., Hardy, J., ... Ule, J. (2017). Major shifts in glial regional identity are a transcriptional Hallmark of human brain aging. *Cell Reports*, 18(2), 557–570. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.011>
- Suk, K. (2016). Lipocalin-2 as a therapeutic target for brain injury: An astrocentric perspective. *Progress in Neurobiology*, 144, 158–172. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.08.001>

- Sullivan, S. M., Bjorkman, S. T., Miller, S. M., Colditz, P. B., & Pow, D. V. (2010). Structural remodeling of gray matter astrocytes in the neonatal pig brain after hypoxia/ischemia. *Glia*, 58(2), 181–194. <https://doi.org/10.1002/glia.20911>
- Sun, D., & Jakobs, T. C. (2012). Structural remodeling of astrocytes in the injured CNS. *The Neuroscientist*, 18(6), 567–588. <https://doi.org/10.1177/1073858411423441>
- Svensson, V., Vento-Tormo, R., & Teichmann, S. A. (2018). Exponential scaling of single-cell RNA-seq in the past decade. *Nature Protocols*, 13(4), 599–604. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.149>
- Switonski, P. M., Szlachcic, W. J., Krzyzosiak, W. J., & Figiel, M. (2015). A new humanized ataxin-3 knock-in mouse model combines the genetic features, pathogenesis of neurons and glia and late disease onset of SCA3/MJD. *Neurobiology of Disease*, 73, 174–188. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.09.020>
- Tachibana, M., Mohri, I., Hirata, I., Kuwada, A., Kimura-Ohba, S., Kagitani-Shimono, K., ... Taniike, M. (2019). Clasmotodendrosis is associated with dendritic spines and does not represent autophagic astrocyte death in influenza-associated encephalopathy. *Brain Development*, 41(1), 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2018.07.008>
- Takano, T., He, W., Han, X., Wang, F., Xu, Q., Wang, X., ... Nedergaard, M. (2014). Rapid manifestation of reactive astrogliosis in acute hippocampal brain slices. *Glia*, 62(1), 78–95. <https://doi.org/10.1002/glia.22588>
- Tarassishin, L., Suh, H. S., & Lee, S. C. (2014). LPS and IL-1 differentially activate mouse and human astrocytes: Role of CD14. *Glia*, 62(6), 999–1013. <https://doi.org/10.1002/glia.22657>
- Tong, X., Ao, Y., Faas, G. C., Nwaobi, S. E., Xu, J., Hausteine, M. D., ... Khakh, B. S. (2014). Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice. *Nature Neuroscience*, 17(5), 694–703. <https://doi.org/10.1038/nn.3691>
- Torigoe, M., Yamauchi, K., Zhu, Y., Kobayashi, H., & Murakami, F. (2015). Association of astrocytes with neurons and astrocytes derived from distinct progenitor domains in the subpallium. *Scientific Reports*, 5, 12258. <https://doi.org/10.1038/srep12258>
- Trias, E., Diaz-Amarilla, P., Olivera-Bravo, S., Isasi, E., Drechsel, D. A., Lopez, N., ... Barbeito, L. (2013). Phenotypic transition of microglia into astrocyte-like cells associated with disease onset in a model of inherited ALS. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 274. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00274>
- Tsai, H. H., Li, H., Fuentealba, L. C., Molofsky, A. V., Taveira-Marques, R., Zhuang, H., ... Rowitch, D. H. (2012). Regional astrocyte allocation regulates CNS synaptogenesis and repair. *Science*, 337(6092), 358–362. <https://doi.org/10.1126/science.1222381>
- Tyzack, G., Lakatos, A., & Patani, R. (2016). Human stem cell-derived astrocytes: Specification and relevance for neurological disorders. *Current Stem Cell Reports*, 2, 236–247. <https://doi.org/10.1007/s40778-016-0049-1>
- Tyzack, G. E., Hall, C. E., Sibley, C. R., Cymes, T., Forostyak, S., Carlino, G., ... Lakatos, A. (2017). A neuroprotective astrocyte state is induced by neuronal signal EphB1 but fails in ALS models. *Nature Communications*, 8(1), 1164. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01283-z>
- Tyzack, G. E., Sitnikov, S., Barson, D., Adams-Carr, K. L., Lau, N. K., Kwok, J. C., ... Lakatos, A. (2014). Astrocyte response to motor neuron injury promotes structural synaptic plasticity via STAT3-regulated TSP-1 expression. *Nature Communications*, 5, 4294. <https://doi.org/10.1038/ncomms5294>
- Valenza, M., Leoni, V., Karasinska, J. M., Petricca, L., Fan, J., Carroll, J., ... Cattaneo, E. (2010). Cholesterol defect is marked across multiple rodent models of Huntington's disease and is manifest in astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 30(32), 10844–10850. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0917-10.2010>
- Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiological Reviews*, 98(1), 239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>
- Verkhatsky, A., Zorec, R., & Parpura, V. (2017). Stratification of astrocytes in healthy and diseased brain. *Brain Pathology*, 27(5), 629–644. <https://doi.org/10.1111/bpa.12537>
- Vonsattel, J. P., Myers, R. H., Stevens, T. J., Ferrante, R. J., Bird, E. D., & Richardson, E. P., Jr. (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 44(6), 559–577.
- Wang, X., Allen, W. E., Wright, M. A., Sylwestrak, E. L., Samusik, N., Vesuna, S., ... Deisseroth, K. (2018). Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. *Science*, 361(6400), eaat5691. <https://doi.org/10.1126/science.aat5691>
- Wanner, I. B., Anderson, M. A., Song, B., Levine, J., Fernandez, A., Gray-Thompson, Z., ... Sofroniew, M. V. (2013). Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience*, 33(31), 12870–12886. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12121-13.2013>
- Wegiel, J., & Wisniewski, H. M. (1994). Rosenthal fibers, eosinophilic inclusions, and anchorage densities with desmosome-like structures in astrocytes in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 87(4), 355–361. <https://doi.org/10.1007/bf00313604>
- Wheeler, M. A., Jaronen, M., Covacu, R., Zandee, S. E. J., Scalisi, G., Rothhammer, V., ... Quintana, F. J. (2019). Environmental control of astrocyte pathogenic activities in CNS inflammation. *Cell*, 176(3), 581. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.012>
- Wheeler, M. A., & Quintana, F. J. (2019). Regulation of astrocyte functions in multiple sclerosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(1), a029009. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029009>
- Wilhelmsson, U., Andersson, D., de Pablo, Y., Pekny, R., Stahlberg, A., Mulder, J., ... Pekna, M. (2017). Injury leads to the appearance of cells with characteristics of both microglia and astrocytes in mouse and human brain. *Cerebral Cortex*, 27(6), 3360–3377. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx069>
- Wilhelmsson, U., Bushong, E. A., Price, D. L., Smarr, B. L., Phung, V., Terada, M., ... Pekny, M. (2006). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46), 17513–17518.
- Wojtowicz, A. M., Dvorzhak, A., Semtner, M., & Grantyn, R. (2013). Reduced tonic inhibition in striatal output neurons from Huntington mice due to loss of astrocytic GABA release through GAT-3. *Front Neural Circuits*, 7, 188. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00188>
- Wu, Y. E., Pan, L., Zuo, Y., Li, X., & Hong, W. (2017). Detecting activated cell populations using single-cell RNA-Seq. *Neuron*, 96(2), 313–329. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.026>
- Wu, Z., Guo, Z., Gearing, M., & Chen, G. (2014). Tonic inhibition in dentate gyrus impairs long-term potentiation and memory in an Alzheimer's disease model. *Nature Communications*, 5, 4159. <https://doi.org/10.1038/ncomms5159>
- Ye, B., Shen, H., Zhang, J., Zhu, Y. G., Ransom, B. R., Chen, X. C., & Ye, Z. C. (2015). Dual pathways mediate beta-amyloid stimulated glutathione release from astrocytes. *Glia*, 63(12), 2208–2219. <https://doi.org/10.1002/glia.22886>
- Yu, X., Taylor, A. M. W., Nagai, J., Golshani, P., Evans, C. J., Coppola, G., & Khakh, B. S. (2018). Reducing astrocyte calcium signaling in vivo alters striatal microcircuits and causes repetitive behavior. *Neuron*, 99(6), 1170–1187. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.015>
- Yun, S. P., Kam, T. I., Panicker, N., Kim, S., Oh, Y., Park, J. S., ... Ko, H. S. (2018). Block of A1 astrocyte conversion by microglia is neuroprotective in models of Parkinson's disease. *Nature Medicine*, 24, 931–938. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0051-5>
- Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R. G., & Barres, B. A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *The Journal of Neuroscience*, 32(18), 6391–6410.

- Zeisel, A., Hochgerner, H., Lonnerberg, P., Johnsson, A., Memic, F., van der Zwan, J., ... Linnarsson, S. (2018). Molecular architecture of the mouse nervous system. *Cell*, 174(4), 999–1014.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.021>
- Zhang, Q., Lenardo, M. J., & Baltimore, D. (2017). 30 years of NF-kappaB: A blossoming of relevance to human pathobiology. *Cell*, 168(1–2), 37–57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.012>
- Zhang, Y., Sloan, S. A., Clarke, L. E., Caneda, C., Plaza, C. A., Blumenthal, P. D., ... Barres, B. A. (2016). Purification and characterization of progenitor and mature human astrocytes reveals transcriptional and functional differences with mouse. *Neuron*, 89(1), 37–53. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.013>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Escartin C, Guillemaud O, Carrillo-de Sauvage M-A. Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia*. 2019;67:2221–2247. <https://doi.org/10.1002/glia.23687>

Références

- A Armstrong, R. (2019). Risk factors for Alzheimer's disease. In *Folia neuropathologica* (Vol. 57, Issue 2, pp. 87–105). NLM (Medline).
<https://doi.org/10.5114/fn.2019.85929>
- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 7, Issue 1, pp. 41–53).
<https://doi.org/10.1038/nrn1824>
- Abdul, H. M., Sama, M. A., Furman, J. L., Mathis, D. M., Beckett, T. L., Weidner, A. M., Patel, E. S., Baig, I., Murphy, M. P., LeVine, H., Kraner, S. D., & Norris, C. M. (2009). Cognitive decline in Alzheimer's disease is associated with selective changes in calcineurin/NFAT signaling. *Journal of Neuroscience*, 29(41), 12957–12969. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1064-09.2009>
- Adamsky, A., Kol, A., Kreisel, T., Doron, A., Ozeri-Engelhard, N., Melcer, T., Refaeli, R., Horn, H., Regev, L., Groysman, M., London, M., & Goshen, I. (2018). Astrocytic Activation Generates De Novo Neuronal Potentiation and Memory Enhancement. *Cell*, 174(1), 59–71.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.002>
- Agulhon, C., Fiacco, T. A., & McCarthy, K. D. (2010). Hippocampal short- and long-term plasticity are not modulated by astrocyte Ca²⁺ signaling. *Science*, 327(5970), 1250–1254. <https://doi.org/10.1126/science.1184821>
- Agulhon, C., Sun, M. Y., Murphy, T., Myers, T., Lauderdale, K., & Fiacco, T. A. (2012). Calcium signaling and gliotransmission in normal vs. Reactive astrocytes. *Frontiers in Pharmacology*, 3 JUL. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00139>
- Al-Dalahmah, O., Sosunov, A. A., Shaik, A., Ofori, K., Liu, Y., Vonsattel, J. P., Adorjan, I., Menon, V., & Goldman, J. E. (2020). Single-nucleus RNA-seq identifies Huntington disease astrocyte states. *Acta Neuropathologica Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s40478-020-0880-6>
- Albert, M. S., DeKosky, S. T., Dickson, D., Dubois, B., Feldman, H. H., Fox, N. C., Gamst, A., Holtzman, D. M., Jagust, W. J., Petersen, R. C., Snyder, P. J., Carrillo, M. C., Thies, B., & Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, 7(3), 270–279.
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.008>
- Allaman, I., Bélanger, M., & Magistretti, P. J. (2011). Astrocyte-neuron metabolic relationships: For better and for worse. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 34, Issue 2, pp. 76–87). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.12.001>
- Alvarez, J. I., Katayama, T., & Prat, A. (2013). Glial influence on the blood brain barrier. In *GLIA* (Vol. 61, Issue 12, pp. 1939–1958). <https://doi.org/10.1002/glia.22575>
- Anderson, M. A., Ao, Y., & Sofroniew, M. V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. In *Neuroscience Letters* (Vol. 565, pp. 23–29). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.030>
- Anderson, M. A., Burda, J. E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T. M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B. S., Deming, T. J., & Sofroniew, M. V. (2016). Astrocyte scar formation AIDS central nervous system axon regeneration. *Nature*, 532(7598), 195–200. <https://doi.org/10.1038/nature17623>
- Angulo, M. C., Kozlov, A. S., Charpak, S., & Audinat, E. (2004). Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 24(31), 6920–6927. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0473-04.2004>

- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P. G., Oliet, S. H. R., Robitaille, R., & Volterra, A. (2014). Gliotransmitters travel in time and space. In *Neuron* (Vol. 81, Issue 4, pp. 728–739). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.007>
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 22, Issue 5, pp. 208–215). [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01349-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01349-6)
- Arranz, A. M., & De Strooper, B. (2019). The role of astroglia in Alzheimer's disease: pathophysiology and clinical implications. In *The Lancet Neurology* (Vol. 18, Issue 4, pp. 406–414). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30490-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30490-3)
- Atri, A. (2019). The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. In *Medical Clinics of North America* (Vol. 103, Issue 2, pp. 263–293). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.009>
- Aur  lie, D., Carole, E., & Nicole, D. (2013). Lentiviral Vectors: A Powerful Tool to Target Astrocytes In Vivo. *Current Drug Targets*, 14(11), 1336–1346. <https://doi.org/10.2174/13894501113146660213>
- Avola, R., Mignini, F., Mazzone, V., Fisichella, A., Zaccheo, D., & Tomassoni, D. (2004). Growth factor-estradiol interaction on DNA labeling and cytoskeletal protein expression in cultured rat astrocytes. *Neuroscience Letters*, 358(3), 177–180. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.01.024>
- Babon, J. J., Kershaw, N. J., Murphy, J. M., Varghese, L. N., Laktyushin, A., Young, S. N., Lucet, I. S., Norton, R. S., & Nicola, N. A. (2012). Suppression of Cytokine Signaling by SOCS3: Characterization of the Mode of Inhibition and the Basis of Its Specificity. *Immunity*, 36(2), 239–250. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.015>
- Babon, J. J., Lucet, I. S., Murphy, J. M., Nicola, N. A., & Varghese, L. N. (2014). The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation. In *Biochemical Journal* (Vol. 462, Issue 1, pp. 1–13). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BJ20140712>
- Bagheri, M., Nair, R. R., Singh, K. K., & Saini, D. K. (2017). ATM-ROS-iNOS axis regulates nitric oxide mediated cellular senescence. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1864(1), 177–190. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.11.008>
- Bagyinszky, E., Giau, V. Van, Shim, K., Suk, K., An, S. S. A., & Kim, S. Y. (2017). Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis. In *Journal of the Neurological Sciences* (Vol. 376, pp. 242–254). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.03.031>
- Bardehle, S., Kr  ger, M., Buggenthin, F., Schwausch, J., Ninkovic, J., Clevers, H., Snippet, H. J., Theis, F. J., Meyer-Luehmann, M., Bechmann, I., Dimou, L., & Götz, M. (2013). Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. *Nature Neuroscience*, 16(5), 580–586. <https://doi.org/10.1038/nn.3371>
- Batiuk, M. Y., Martirosyan, A., Wahis, J., de Vin, F., Marneffe, C., Kusserow, C., Koeppen, J., Viana, J. F., Oliveira, J. F., Voet, T., Ponting, C. P., Belgard, T. G., & Holt, M. G. (2020). Identification of region-specific astrocyte subtypes at single cell resolution. *Nature Communications*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14198-8>
- Bayraktar, O. A., Bartels, T., Holmqvist, S., Kleshchevnikov, V., Martirosyan, A., Polioudakis, D., Ben Haim, L., Young, A. M. H., Batiuk, M. Y., Prakash, K.,

- Brown, A., Roberts, K., Paredes, M. F., Kawaguchi, R., Stockley, J. H., Sabeur, K., Chang, S. M., Huang, E., Hutchinson, P., ... Rowitch, D. H. (2020). Astrocyte layers in the mammalian cerebral cortex revealed by a single-cell in situ transcriptomic map. *Nature Neuroscience*, 23(4). <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0602-1>
- Bayraktar, O. A., Fuentealba, L. C., Alvarez-Buylla, A., & Rowitch, D. H. (2015). Astrocyte development and heterogeneity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020362>
- Bazargani, N., & Attwell, D. (2016). Astrocyte calcium signaling: The third wave. In *Nature Neuroscience* (Vol. 19, Issue 2, pp. 182–189). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nn.4201>
- Beenhakker, M. P., & Huguenard, J. R. (2010). Astrocytes as gatekeepers of GABAB receptor function. *Journal of Neuroscience*, 30(45), 15262–15276. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3243-10.2010>
- Belkina, A. C., Ciccolella, C. O., Anno, R., Halpert, R., Spidlen, J., & Snyder-Cappione, J. E. (2019). Automated optimized parameters for T-distributed stochastic neighbor embedding improve visualization and analysis of large datasets. *Nature Communications*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13055-y>
- Bellot-Saez, A., Kékesi, O., Morley, J. W., & Buskila, Y. (2017). Astrocytic modulation of neuronal excitability through K⁺ spatial buffering. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 77, pp. 87–97). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.03.002>
- Ben Haim, L., & Rowitch, D. H. (2016). Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 18, Issue 1, pp. 31–41). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.159>
- Ben Haim, L., Carrillo-de-Sauvage, M., Ceyzériat, K., Escartin, C. (2015a). Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 9:278. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00278>
- Ben Haim, L., Ceyzériat, K., Carrillo-de-Sauvage, M., Aubry, F., Auregan, G., Guillermier, M., Ruiz, M., Petit, F., Houitte, D., Faivre, E., Vandesquille, M., Aron-Badin, R., Dhenain, M., Déglon, N., Hantraye, P., Brouillet, E., Bonvento, G. and Escartin, C. (2015b). The JAK/STAT3 pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's disease. *Journal of Neuroscience*. 35(6), 2817–2829. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3516-14.2015>
- Bennett, R. E., DeVos, S. L., Dujardin, S., Corjuc, B., Gor, R., Gonzalez, J., Roe, A. D., Frosch, M. P., Pitstick, R., Carlson, G. A., & Hyman, B. T. (2017). Enhanced Tau Aggregation in the Presence of Amyloid β . *American Journal of Pathology*, 187(7), 1601–1612. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.03.011>
- Berkers, C. R., Van Leeuwen, F. W. B., Groothuis, T. A., Peperzak, V., Van Tilburg, E. W., Borst, J., Neefjes, J. J., & Ova, H. (2007). Profiling proteasome activity in tissue with fluorescent probes. *Molecular Pharmaceutics*, 4(5), 739–748. <https://doi.org/10.1021/mp0700256>
- Bernardinelli, Y., Randall, J., Janett, E., Nikonenko, I., König, S., Jones, E. V., Flores, C. E., Murai, K. K., Bochet, C. G., Holtmaat, A., & Muller, D. (2014). Activity-dependent structural plasticity of perisynaptic astrocytic domains promotes excitatory synapse stability. *Current Biology*, 24(15), 1679–1688. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.025>
- Bertolo, A., Baur, M., Guerrero, J., Pötzel, T., & Stoyanov, J. (2019). Autofluorescence

- is a Reliable in vitro Marker of Cellular Senescence in Human Mesenchymal Stromal Cells. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38546-2>
- Bialas, A. R., & Stevens, B. (2013). TGF- β signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement. *Nature Neuroscience*, 16(12), 1773–1782. <https://doi.org/10.1038/nn.3560>
- Bindocci, E., Savtchouk, I., Liaudet, N., Becker, D., Carriero, G., & Volterra, A. (2017). Neuroscience: Three-dimensional Ca²⁺ imaging advances understanding of astrocyte biology. *Science*, 356(6339). <https://doi.org/10.1126/science.aai8185>
- Bohn, A. B., Moller, B. K., & Petersen, M. S. (2015). Flow cytometry and compensation of highly autofluorescent cells: the example of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Biology and Research*, 2(1), 4. <https://doi.org/10.7243/2054-717x-2-4>
- Boisvert, M. M., Erikson, G. A., Shokhirev, M. N., & Allen, N. J. (2018). The Aging Astrocyte Transcriptome from Multiple Regions of the Mouse Brain. *Cell Reports*, 22(1), 269–285. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.039>
- Boulay, A. C., Cisternino, S., & Cohen-Salmon, M. (2016). Immunoregulation at the gliovascular unit in the healthy brain: A focus on Connexin 43. In *Brain, Behavior, and Immunity* (Vol. 56, pp. 1–9). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.11.017>
- Boulay, A. C., Saubameá, B., Adam, N., Chasseigneaux, S., Mazaré, N., Gilbert, A., Bahin, M., Bastianelli, L., Blugeon, C., Perrin, S., Pouch, J., Ducos, B., Le Crom, S., Genovesio, A., Chrétien, F., Declèves, X., Laplanche, J. L., & Cohen-Salmon, M. (2017). Translation in astrocyte distal processes sets molecular heterogeneity at the gliovascular interface. *Cell Discovery*, 3. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2017.5>
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 82, Issue 4, pp. 239–259). Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/BF00308809>
- Brambilla, R., Persaud, T., Hu, X., Karmally, S., Shestopalov, V. I., Dvorianchikova, G., Ivanov, D., Nathanson, L., Barnum, S. R., & Bethea, J. R. (2009). Transgenic Inhibition of Astroglial NF- κ B Improves Functional Outcome in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Suppressing Chronic Central Nervous System Inflammation. *The Journal of Immunology*, 182(5), 2628–2640. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802954>
- Bribián, A., Figueres-Oñate, M., Martín-López, E., & López-Mascaraque, L. (2016). Decoding astrocyte heterogeneity: New tools for clonal analysis. In *Neuroscience* (Vol. 323, pp. 10–19). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.036>
- Bribian, A., Pérez-Cerdá, F., Matute, C., & López-Mascaraque, L. (2018). Clonal glial response in a multiple sclerosis mouse model. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00375>
- Brooks, A. J., Dai, W., O'Mara, M. L., Abankwa, D., Chhabra, Y., Pelekanos, R. A., Gardon, O., Tunny, K. A., Blucher, K. M., Morton, C. J., Parker, M. W., Sieracki, E., Gambin, Y., Gomez, G. A., Alexandrov, K., Wilson, I. A., Doxastakis, M., Mark, A. E., & Waters, M. J. (2014). Mechanism of activation of protein kinase JAK2 by the growth hormone receptor. *Science*, 344(6185). <https://doi.org/10.1126/science.1249783>
- Buffo, A., Rolando, C., & Ceruti, S. (2010). Astrocytes in the damaged brain: Molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. In *Biochemical Pharmacology* (Vol. 79, Issue 2, pp. 77–89). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.09.014>

- Buosi, A. S., Matias, I., Araujo, A. P. B., Batista, C., & Gomes, F. C. A. (2017). Heterogeneity in Synaptogenic Profile of Astrocytes from Different Brain Regions. *Molecular Neurobiology*, 55(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0343-z>
- Burda, J. E., & Sofroniew, M. V. (2014). Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. In *Neuron* (Vol. 81, Issue 2, pp. 229–248). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.034>
- Buschke, H. (1984). Cued Recall in Amnesia*. *Journal of Clinical Neuropsychology*, 6(4), 433–440. <https://doi.org/10.1080/01688638408401233>
- Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z., & Ellisman, M. H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *Journal of Neuroscience*, 22(1), 183–192. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-01-00183.2002>
- C, B., C, A., R, P., M, T., MJ, S., S, D., & A, M. (2004). Activated p38MAPK Is a Novel Component of the Intracellular Inclusions Found in Human Amyotrophic Lateral Sclerosis and Mutant SOD1 Transgenic Mice. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 63(2). <https://doi.org/10.1093/JNEN/63.2.113>
- Cahoy, J. D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., Christopherson, K. S., Xing, Y., Lubischer, J. L., Krieg, P. A., Krupenko, S. A., Thompson, W. J., & Barres, B. A. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: A new resource for understanding brain development and function. *Journal of Neuroscience*, 28(1), 264–278. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008>
- Cao, J., Zhong, M. B., Toro, C. A., Zhang, L., & Cai, D. (2019). Endo-lysosomal pathway and ubiquitin-proteasome system dysfunction in Alzheimer's disease pathogenesis. In *Neuroscience Letters* (Vol. 703, pp. 68–78). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.03.016>
- Carter, S. F., Herholz, K., Rosa-Neto, P., Pellerin, L., Nordberg, A., & Zimmer, E. R. (2019). Astrocyte Biomarkers in Alzheimer's Disease. In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 25, Issue 2, pp. 77–95). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.11.006>
- Castro-Fuentes, R., & Socas-Pérez, R. (2013). Octodon degus: A strong attractor for alzheimer research. *Basic and Clinical Neuroscience*, 4(1), 91–96.
- Ceyzériat, K., Abjean, L., Carrillo-de Sauvage, M. A., Ben Haim, L., & Escartin, C. (2016). The complex STATes of astrocyte reactivity: How are they controlled by the JAK-STAT3 pathway? In *Neuroscience* (Vol. 330, pp. 205–218). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.043>
- Ceyzériat, K., Ben Haim, L., Denizot, A., Pommier, D., Matos, M., Guillemaud, O., Palomares, M. A., Abjean, L., Petit, F., Gipchtein, P., Gaillard, M. C., Guillermier, M., Bernier, S., Gaudin, M., Aurégan, G., Joséphine, C., Déchamps, N., Veran, J., Langlais, V., ... Escartin, C. (2018). Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0606-1>
- Chai, H., Diaz-Castro, B., Shigetomi, E., Monte, E., Ochteau, J. C., Yu, X., Cohn, W., Rajendran, P. S., Vondriska, T. M., Whitelegge, J. P., Coppola, G., & Khakh, B. S. (2017a). Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence. *Neuron*, 95(3), 531–549.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.029>
- Chen, W.-T., Lu, A., Craessaerts, K., Pavie, B., Frigerio, C. S., Mancuso, R., Qian, X., Lalakova, J., Kühnemund, M., Voytyuk, I., Wolfs, L., Snellinx, A., Munck, S.,

- Jurek, A., Navarro, J. F., Saido, T. C., Lundeberg, J., Fiers, M., & Strooper, B. De. (2019). Spatial and temporal transcriptomics reveal microglia-astroglia crosstalk in the amyloid- β plaque cell niche of Alzheimer's disease. *BioRxiv*, 719930. <https://doi.org/10.1101/719930>
- Chen, X., Chen, C., Hao, J., Zhang, J., & Zhang, F. (2018). Effect of CLIP3 Upregulation on Astrocyte Proliferation and Subsequent Glial Scar Formation in the Rat Spinal Cord via STAT3 Pathway After Injury. *Journal of Molecular Neuroscience*, 64(1), 117–128. <https://doi.org/10.1007/s12031-017-0998-6>
- Chen, Z., Huang, C., Yang, Y. L., Ding, Y., Ou-Yang, H. Q., Zhang, Y. Y., & Xu, M. (2012). Inhibition of the STAT3 signaling pathway is involved in the antitumor activity of cepharanthine in SaOS2 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(1), 101–108. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.164>
- Cheng, X., Yeung, P. K. K., Zhong, K., Zilundu, P. L. M., Zhou, L., & Chung, S. K. (2019). Astrocytic endothelin-1 overexpression promotes neural progenitor cells proliferation and differentiation into astrocytes via the Jak2/Stat3 pathway after stroke. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1597-y>
- Choi, D. J., Kwon, J. K., & Joe, E. H. (2018). A Parkinson's disease gene, DJ-1, regulates astrogliosis through STAT3. *Neuroscience Letters*, 685, 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.08.025>
- Chun, H., & Lee, C. J. (2018). Reactive astrocytes in Alzheimer's disease: A double-edged sword. In *Neuroscience Research* (Vol. 126, pp. 44–52). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.11.012>
- Chung, W. S., Allen, N. J., & Eroglu, C. (2015). Astrocytes control synapse formation, function, and elimination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020370>
- Chung, W. S., Clarke, L. E., Wang, G. X., Stafford, B. K., Sher, A., Chakraborty, C., Joung, J., Foo, L. C., Thompson, A., Chen, C., Smith, S. J., & Barres, B. A. (2013). Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature*, 504(7480), 394–400. <https://doi.org/10.1038/nature12776>
- Chung, W. S., Verghese, P. B., Chakraborty, C., Joung, J., Hyman, B. T., Ulrich, J. D., Holtzman, D. M., & Barres, B. A. (2016). Novel allele-dependent role for APOE in controlling the rate of synapse pruning by astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(36), 10186–10191. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609896113>
- Clarke, L. E., & Barres, B. A. (2013). Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 14, Issue 5, pp. 311–321). <https://doi.org/10.1038/nrn3484>
- Clarke, L. E., Liddelow, S. A., Chakraborty, C., Münch, A. E., Heiman, M., & Barres, B. A. (2018). Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(8), E1896–E1905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800165115>
- Clasadonte, J., Morel, L., Barrios-Camacho, C. M., Chiang, M. S. R., Zhang, J., Iyer, L., Haydon, P. G., & Yang, Y. (2016). Molecular analysis of acute and chronic reactive astrocytes in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease*, 91, 315–325. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.03.024>
- Clavreul, S., Abdeladim, L., Hernández-Garzón, E., Niculescu, D., Durand, J., Ieng, S. H., Barry, R., Bonvento, G., Beaupaire, E., Livet, J., & Loulier, K. (2019).

- Cortical astrocytes develop in a plastic manner at both clonal and cellular levels. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12791-5>
- Clinton, L. K., Billings, L. M., Green, K. N., Caccamo, A., Ngo, J., Oddo, S., McGaugh, J. L., & LaFerla, F. M. (2007). Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiology of Disease*, 28(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.06.013>
- Colin, A., Faideau, M., Dufour, N., Auregan, G., Hassig, R., Andrieu, T., Brouillet, E., Hantraye, P., Bonvento, G., & Déglon, N. (2009). Engineered lentiviral vector targeting astrocytes in vivo. *Glia*, 57(6), 667–679. <https://doi.org/10.1002/glia.20795>
- Cranfill, P. J., Sell, B. R., Baird, M. A., Allen, J. R., Lavagnino, Z., De Gruiter, H. M., Kremers, G. J., Davidson, M. W., Ustione, A., & Piston, D. W. (2016). Quantitative assessment of fluorescent proteins. *Nature Methods*, 13(7), 557–562. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3891>
- Cunningham, C., Dunne, A., & Lopez-Rodriguez, A. B. (2019). Astrocytes: Heterogeneous and Dynamic Phenotypes in Neurodegeneration and Innate Immunity. In *Neuroscientist* (Vol. 25, Issue 5, pp. 455–474). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1073858418809941>
- D'Ambrosio, R., Wenzel, J., Schwartzkroin, P. A., McKhann, G. M., & Janigro, D. (1998). Functional specialization and topographic segregation of hippocampal astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 18(12), 4425–4438. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-12-04425.1998>
- da Hora, C. C., Pinkham, K., Carvalho, L., Zinter, M., Tabet, E., Nakano, I., Tannous, B. A., & Badr, C. E. (2019). Sustained NF- κ B-STAT3 signaling promotes resistance to Smac mimetics in Glioma stem-like cells but creates a vulnerability to EZH2 inhibition. *Cell Death Discovery*, 5(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41420-019-0155-9>
- Dallérac, G., Zapata, J., & Rouach, N. (2018). Versatile control of synaptic circuits by astrocytes: where, when and how? In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 19, Issue 12, pp. 729–743). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0080-6>
- Danbolt, N. C., Furness, D. N., & Zhou, Y. (2016). Neuronal vs glial glutamate uptake: Resolving the conundrum. In *Neurochemistry International* (Vol. 98, pp. 29–45). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.05.009>
- Darnell, J. E. (1997). STATs and gene regulation. *Science*, 277(5332), 1630–1635. <https://doi.org/10.1126/science.277.5332.1630>
- Darnell, J. E., Kerr, I. M., & Stark, G. R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264(5164), 1415–1421. <https://doi.org/10.1126/science.8197455>
- De, S., Whiten, D. R., Ruggeri, F. S., Hughes, C., Rodrigues, M., Sideris, D. I., Taylor, C. G., Aprile, F. A., Muyldermans, S., Knowles, T. P. J., Vendruscolo, M., Bryant, C., Blennow, K., Skoog, I., Kern, S., Zetterberg, H., & Klenerman, D. (2019). Soluble aggregates present in cerebrospinal fluid change in size and mechanism of toxicity during Alzheimer's disease progression. *Acta Neuropathologica Communications*, 7(1), 120. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0777-4>
- Dean, D. C., Hurley, S. A., Kecskemeti, S. R., O'Grady, J. P., Canda, C., Davenport-Sis, N. J., Carlsson, C. M., Zetterberg, H., Blennow, K., Asthana, S., Sager, M. A., Johnson, S. C., Alexander, A. L., & Bendlin, B. B. (2017). Association of amyloid

- pathology with myelin alteration in preclinical Alzheimer disease. *JAMA Neurology*, 74(1), 41–49. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.3232>
- Decker, T., & Kovarik, P. (2000). Serine phosphorylation of STATs. In *Oncogene* (Vol. 19, Issue 21, pp. 2628–2637). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203481>
- Déglon, N., Tseng, J. L., Bensadoun, J. C., Zurn, A. D., Arsenijevic, Y., De Almeida, L. P., Zufferey, R., Trono, D., & Aebischer, P. (2000). Self-inactivating lentiviral vectors with enhanced transgene expression as potential gene transfer system in Parkinson's disease. *Human Gene Therapy*, 11(1), 179–190. <https://doi.org/10.1089/10430340050016256>
- Delekate, A., Fächtemeier, M., Schumacher, T., Ulbrich, C., Foddis, M., & Petzold, G. C. (2014). Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms6422>
- Desai, B. S., Monahan, A. J., Carvey, P. M., & Hendey, B. (2007). Blood-brain barrier pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease: Implications for drug therapy. *Cell Transplantation*, 16(3), 285–299. <https://doi.org/10.3727/000000007783464731>
- Díaz-Castro, B., Gangwani, M. R., Yu, X., Coppola, G., & Khakh, B. S. (2019). Astrocyte molecular signatures in Huntington's disease. *Science Translational Medicine*, 11(514). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw8546>
- Díaz-García, C. M., & Yellen, G. (2019). Neurons rely on glucose rather than astrocytic lactate during stimulation. In *Journal of Neuroscience Research* (Vol. 97, Issue 8, pp. 883–889). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jnr.24374>
- Dienel, G. A. (2019). Brain glucose metabolism: Integration of energetics with function. *Physiological Reviews*, 99(1), 949–1045. <https://doi.org/10.1152/physrev.00062.2017>
- Dikic, I. (2017). Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 193–224. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044908>
- Dimou, L., & Götz, M. (2014). Glial cells as progenitors and stem cells: New roles in the healthy and diseased brain. In *Physiological Reviews* (Vol. 94, Issue 3, pp. 709–737). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2013>
- Dong, X. X., Wang, Y., & Qin, Z. H. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. In *Acta Pharmacologica Sinica* (Vol. 30, Issue 4, pp. 379–387). Acta Pharmacol Sin. <https://doi.org/10.1038/aps.2009.24>
- Dorey, E., Chang, N., Liu, Q. Y., Yang, Z., & Zhang, W. (2014). Apolipoprotein E, amyloid-beta, and neuroinflammation in Alzheimer's disease. In *Neuroscience Bulletin* (Vol. 30, Issue 2, pp. 317–330). Science Press. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1422-z>
- Douglass, J. D., Dorfman, M. D., & Thaler, J. P. (2017). Glia: silent partners in energy homeostasis and obesity pathogenesis. In *Diabetologia* (Vol. 60, Issue 2, pp. 226–236). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4181-3>
- Doyle, J. P., Dougherty, J. D., Heiman, M., Schmidt, E. F., Stevens, T. R., Ma, G., Bupp, S., Shrestha, P., Shah, R. D., Doughty, M. L., Gong, S., Greengard, P., & Heintz, N. (2008). Application of a Translational Profiling Approach for the Comparative Analysis of CNS Cell Types. *Cell*, 135(4), 749–762. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.029>
- Eckardt, D., Theis, M., Degen, J., Ott, T., Van Rijen, H. V. M., Kirchhoff, S., Kim, J.

- S., De Bakker, J. M. T., & Willecke, K. (2004). Functional role of connexin43 gap junction channels in adult mouse heart assessed by inducible gene deletion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 36(1), 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2003.10.006>
- Eftekharzadeh, B., Daigle, J. G., Kapinos, L. E., Coyne, A., Schiantarelli, J., Carlomagno, Y., Cook, C., Miller, S. J., Dujardin, S., Amaral, A. S., Grima, J. C., Bennett, R. E., Tepper, K., DeTure, M., Vanderburgh, C. R., Corjuc, B. T., DeVos, S. L., Gonzalez, J. A., Chew, J., ... Hyman, B. T. (2018). Tau Protein Disrupts Nucleocytoplasmic Transport in Alzheimer's Disease. *Neuron*, 99(5), 925–940.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.039>
- Emmerling, M. R., Watson, M. D., Raby, C. A., & Spiegel, K. (2000). The role of complement in Alzheimer's disease pathology. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1502, Issue 1, pp. 158–171). Biochim Biophys Acta. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(00\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(00)00042-9)
- Emsley, J. G., & Macklis, J. D. (2006). Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biology*, 2(3), 175–186. <https://doi.org/10.1017/S1740925X06000202>
- Eng, L. F. (1985). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *Journal of Neuroimmunology*, 8(C), 203–214. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(85\)80063-1](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(85)80063-1)
- Escartin, C., Brouillet, E., Gubellini, P., Trioulier, Y., Jacquard, C., Smadja, C., Knott, G. W., Goff, L. K. Le, Déglon, N., Hantraye, P., & Bonvento, G. (2006). Ciliary neurotrophic factor activates astrocytes, redistributes their glutamate transporters GLAST and GLT-1 to raft microdomains, and improves glutamate handling in vivo. *Journal of Neuroscience*, 26(22), 5978–5989. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0302-06.2006>
- Escartin, C., Guillemaud, O., & Carrillo-de Sauvage, M. A. (2019). Questions and (some) answers on reactive astrocytes. In *GLIA* (Vol. 67, Issue 12, pp. 2221–2247). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/glia.23687>
- Esquerda-Canals, G., Montoliu-Gaya, L., Güell-Bosch, J., & Villegas, S. (2017). Mouse Models of Alzheimer's Disease. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 57, Issue 4, pp. 1171–1183). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-170045>
- Everhart, M. B., Han, W., Sherrill, T. P., Arutiunov, M., Polosukhin, V. V., Burke, J. R., Sadikot, R. T., Christman, J. W., Yull, F. E., & Blackwell, T. S. (2006). Duration and Intensity of NF-κB Activity Determine the Severity of Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. *The Journal of Immunology*, 176(8), 4995–5005. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.8.4995>
- Ezran, C., Karanewsky, C. J., Pendleton, J. L., Sholtz, A., Krasnow, M. R., Willick, J., Razafindrakoto, A., Zohdy, S., Albertelli, M. A., & Krasnow, M. A. (2017). The mouse lemur, a genetic model organism for primate biology, behavior, and health. In *Genetics* (Vol. 206, Issue 2, pp. 651–664). Genetics. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.199448>
- Fan, Y., Mao, R., & Yang, J. (2013). NF-κB and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. In *Protein and Cell* (Vol. 4, Issue 3, pp. 176–185). Higher Education Press. <https://doi.org/10.1007/s13238-013-2084-3>
- Fernandez, A. M., Jimenez, S., Mecha, M., Dávila, D., Guaza, C., Vitorica, J., & Torres-Aleman, I. (2012). Regulation of the phosphatase calcineurin by insulin-like growth factor i unveils a key role of astrocytes in Alzheimer's pathology. *Molecular*

- Psychiatry*, 17(7), 705–718. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.128>
- Fernandez, Ana M., Fernandez, S., Carrero, P., Garcia-Garcia, M., & Torres-Aleman, I. (2007). Calcineurin in reactive astrocytes plays a key role in the interplay between proinflammatory and anti-inflammatory signals. *Journal of Neuroscience*, 27(33), 8745–8756. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1002-07.2007>
- Ferrer, I., Blanco, R., Carmona, M., & Puig, B. (2001). Phosphorylated mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK-P), protein kinase of 38kDa (p38-P), stress-activated protein kinase (SAPK/JNK-P), and calcium/calmodulin-dependent kinase II (CaM kinase II) are differentially expressed in tau deposits in neurons and glial cells in tauopathies. *Journal of Neural Transmission*, 108(12), 1397–1415. <https://doi.org/10.1007/s007020100016>
- Fiacco, T. A., & McCarthy, K. D. (2018). Multiple Lines of Evidence Indicate That Gliotransmission Does Not Occur under Physiological Conditions. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 38(1), 3–13. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0016-17.2017>
- Fischer, A. J., Omar, G., Eubanks, J., McGuire, C. R., Dierks, B. D., & Reh, T. A. (2004). Different aspects of gliosis in retinal Muller glia can be induced by CNTF, insulin, and FGF2 in the absence of damage. *Molecular Vision*, 10, 973–986. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15623987>
- Foo, L. C., Allen, N. J., Bushong, E. A., Ventura, P. B., Chung, W. S., Zhou, L., Cahoy, J. D., Daneman, R., Zong, H., Ellisman, M. H., & Barres, B. A. (2011). Development of a method for the purification and culture of rodent astrocytes. *Neuron*, 71(5), 799–811. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.022>
- Freeman, M. R. (2015). Drosophila central nervous system glia. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (Vol. 7, Issue 11). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020552>
- Freeman, M. R., & Rowitch, D. H. (2013). Evolving concepts of gliogenesis: A look way back and ahead to the next 25 years. In *Neuron* (Vol. 80, Issue 3, pp. 613–623). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.034>
- Friedman, B. A., Srinivasan, K., Ayalon, G., Meilandt, W. J., Lin, H., Huntley, M. A., Cao, Y., Lee, S. H., Haddick, P. C. G., Ngu, H., Modrusan, Z., Larson, J. L., Kaminker, J. S., van der Brug, M. P., & Hansen, D. V. (2018). Diverse Brain Myeloid Expression Profiles Reveal Distinct Microglial Activation States and Aspects of Alzheimer's Disease Not Evident in Mouse Models. *Cell Reports*, 22(3), 832–847. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.066>
- Frik, J., Merl-Pham, J., Plesnila, N., Mattugini, N., Kjell, J., Kraska, J., Gómez, R. M., Hauck, S. M., Sirko, S., & Götz, M. (2018). Cross-talk between monocyte invasion and astrocyte proliferation regulates scarring in brain injury. *EMBO Reports*, 19(5). <https://doi.org/10.15252/embr.201745294>
- Fuchs, E., & Cleveland, D. W. (1998). A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. In *Science* (Vol. 279, Issue 5350, pp. 514–519). Science. <https://doi.org/10.1126/science.279.5350.514>
- Fujita, A., Yamaguchi, H., Yamasaki, R., Cui, Y., Matsuoka, Y., Yamada, K. ichi, & Kira, J. ichi. (2018). Connexin 30 deficiency attenuates A2 astrocyte responses and induces severe neurodegeneration in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine hydrochloride Parkinson's disease animal model. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1251-0>
- Funahashi, S. (2017). Working memory in the prefrontal cortex. In *Brain Sciences* (Vol. 7,

- Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/brainsci7050049>
- Furman, J. L., & Norris, C. M. (2014). Calcineurin and glial signaling: Neuroinflammation and beyond. In *Journal of Neuroinflammation* (Vol. 11, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0158-7>
- Furman, J. L., Sama, D. M., Gant, J. C., Beckett, T. L., Murphy, M. P., Bachstetter, A. D., van Eldik, L. J., & Norris, C. M. (2012). Targeting astrocytes Ameliorates neurologic changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 32(46), 16129–16140. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2323-12.2012>
- Galimberti, D., Schoonenboom, N., Scheltens, P., Fenoglio, C., Bouwman, F., Venturelli, E., Guidi, I., Blankenstein, M. A., Bresolin, N., & Scarpini, E. (2006). Intrathecal chemokine synthesis in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 63(4), 538–543. <https://doi.org/10.1001/archneur.63.4.538>
- García-Marín, V., García-López, P., & Freire, M. (2007). Cajal's contributions to glia research. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 30, Issue 9, pp. 479–487). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.06.008>
- Garcia, A. D. R., Petrova, R., Eng, L., & Joyner, A. L. (2010). Sonic Hedgehog regulates discrete populations of astrocytes in the adult mouse forebrain. *Journal of Neuroscience*, 30(41), 13597–13608. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0830-10.2010>
- Ghézali, G., Vasile, F., Curry, N., Fantham, M., Cheung, G., Ezan, P., Cohen-Salmon, M., Kaminski, C., & Rouach, N. (2020). Neuronal Activity Drives Astroglial Connexin 30 in Perisynaptic Processes and Shapes Its Functions. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 30(2), 753–766. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz123>
- Gibbs, M. E., Hutchinson, D., & Hertz, L. (2008). Astrocytic involvement in learning and memory consolidation. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 32, Issue 5, pp. 927–944). Neurosci Biobehav Rev. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.02.001>
- Goetzl, E. J., Schwartz, J. B., Abner, E. L., Jicha, G. A., & Kapogiannis, D. (2018). High complement levels in astrocyte-derived exosomes of Alzheimer disease. *Annals of Neurology*, 83(3), 544–552. <https://doi.org/10.1002/ana.25172>
- González-Reyes, R. E., Nava-Mesa, M. O., Vargas-Sánchez, K., Ariza-Salamanca, D., & Mora-Muñoz, L. (2017). Involvement of astrocytes in Alzheimer's disease from a neuroinflammatory and oxidative stress perspective. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00427>
- Gourine, A. V., Kasymov, V., Marina, N., Tang, F., Figueiredo, M. F., Lane, S., Teschemacher, A. G., Spyer, K. M., Deisseroth, K., & Kasparov, S. (2010). Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science*, 329(5991), 571–575. <https://doi.org/10.1126/science.1190721>
- Griemsmann, S., Höft, S. P., Bedner, P., Zhang, J., von Staden, E., Beinhauer, A., Degen, J., Dublin, P., Cope, D. W., Richter, N., Crunelli, V., Jabs, R., Willecke, K., Theis, M., Seifert, G., Kettenmann, H., & Steinhäuser, C. (2015). Characterization of Panglial Gap Junction Networks in the Thalamus, Neocortex, and Hippocampus Reveals a Unique Population of Glial Cells. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 25(10), 3420–3433. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu157>
- Grivennikov, S. I., & Karin, M. (2010). Dangerous liaisons: STAT3 and NF-κB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 21(1),

- 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.11.005>
- Grubman, A., Chew, G., Ouyang, J. F., Sun, G., Choo, X. Y., McLean, C., Simmons, R. K., Buckberry, S., Vargas-Landin, D. B., Poppe, D., Pflueger, J., Lister, R., Rackham, O. J. L., Petretto, E., & Polo, J. M. (2019). A single-cell atlas of entorhinal cortex from individuals with Alzheimer's disease reveals cell-type-specific gene expression regulation. *Nature Neuroscience*, 22(12), 2087–2097. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0539-4>
- Gu, Y., Mohammad, I. S., & Liu, Z. (2020). Overview of the STAT-3 signaling pathway in cancer and the development of specific inhibitors (Review). In *Oncology Letters* (Vol. 19, Issue 4, pp. 2585–2594). Spandidos Publications. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11394>
- Gutierrez, H., & Davies, A. M. (2011). Regulation of neural process growth, elaboration and structural plasticity by NF- κ B. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 34, Issue 6, pp. 316–325). Trends Neurosci. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.03.001>
- Guttenplan, K. A., & Liddelow, S. A. (2019). Astrocytes and microglia: Models and tools. In *Journal of Experimental Medicine* (Vol. 216, Issue 1, pp. 71–83). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1084/jem.20180200>
- Haan, S., Wüller, S., Kaczor, J., Rolvering, C., Nöcker, T., Behrmann, I., & Haan, C. (2009). SOCS-mediated downregulation of mutant Jak2 (V617F, T875N and K539L) counteracts cytokine-independent signaling. *Oncogene*, 28(34), 3069–3080. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.155>
- Habib, N., McCabe, C., Medina, S., Varshavsky, M., Kitsberg, D., Dvir-Szternfeld, R., Green, G., Dionne, D., Nguyen, L., Marshall, J. L., Chen, F., Zhang, F., Kaplan, T., Regev, A., & Schwartz, M. (2020). Disease-associated astrocytes in Alzheimer's disease and aging. *Nature Neuroscience*, 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0624-8>
- Haim, L. Ben, Carrillo-de Sauvage, M. A., Ceyzeriat, K., & Escartin, C. (2015). Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 9, Issue AUGUST). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00278>
- Haim, L. Ben, Ceyzeriat, K., Sauvage, M. A. C. de, Aubry, F., Auregan, G., Guillermier, M., Ruiz, M., Petit, F., Houitte, D., Faivre, E., Vandesquille, M., Aron-Badin, R., Dhenain, M., Déglon, N., Hantraye, P., Brouillet, E., Bonvento, G., & Escartin, C. (2015). The JAK/STAT3 pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's diseases. *Journal of Neuroscience*, 35(6), 2817–2829. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3516-14.2015>
- Halassa, M. M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J. H., & Haydon, P. G. (2007). Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *Journal of Neuroscience*, 27(24), 6473–6477. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1419-07.2007>
- Halassa, M. M., Florian, C., Fellin, T., Munoz, J. R., Lee, S. Y., Abel, T., Haydon, P. G., & Frank, M. G. (2009). Astrocytic Modulation of Sleep Homeostasis and Cognitive Consequences of Sleep Loss. *Neuron*, 61(2), 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.024>
- Hamby, M. E., Coppola, G., Ao, Y., Geschwind, D. H., Khakh, B. S., & Sofroniew, M. V. (2012). Inflammatory mediators alter the astrocyte transcriptome and calcium signaling elicited by multiple G-protein-coupled receptors. *Journal of Neuroscience*, 32(42), 14489–14510. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1256-12.2012>
- Han, C. L., Ge, M., Liu, Y. P., Zhao, X. M., Wang, K. L., Chen, N., Meng, W. J., Hu,

- W., Zhang, J. G., Li, L., & Meng, F. G. (2018). LncRNA H19 contributes to hippocampal glial cell activation via JAK/STAT signaling in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1139-z>
- Hara, M., Kobayakawa, K., Ohkawa, Y., Kumamaru, H., Yokota, K., Saito, T., Kijima, K., Yoshizaki, S., Harimaya, K., Nakashima, Y., & Okada, S. (2017). Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury. *Nature Medicine*, 23(7), 818–828. <https://doi.org/10.1038/nm.4354>
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. In *Science* (Vol. 256, Issue 5054, pp. 184–185). Science. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>
- Haung Yu, W., Cuervo, A. M., Kumar, A., Peterhoff, C. M., Schmidt, S. D., Lee, J. H., Mohan, P. S., Mercken, M., Farmery, M. R., Tjernberg, L. O., Jiang, Y., Duff, K., Uchiyama, Y., Näslund, J., Mathews, P. M., Cataldo, A. M., & Nixon, R. A. (2005). Macroautophagy - A novel β -amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *Journal of Cell Biology*, 171(1), 87–98. <https://doi.org/10.1083/jcb.200505082>
- Haydon, P. G. (2017). Astrocytes and the modulation of sleep. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 44, pp. 28–33). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.02.008>
- Hefendehl, J. K., LeDue, J., Ko, R. W. Y., Mahler, J., Murphy, T. H., & MacVicar, B. A. (2016). Mapping synaptic glutamate transporter dysfunction in vivo to regions surrounding A β plaques by iGluSnFR two-photon imaging. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13441>
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G., & Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. In *Biochemical Journal* (Vol. 374, Issue 1, pp. 1–20). Biochem J. <https://doi.org/10.1042/BJ20030407>
- Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. El, Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. In *The Lancet Neurology* (Vol. 14, Issue 4, pp. 388–405). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., & Latz, E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 14, Issue 7, pp. 463–477). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri3705>
- Henrik Heiland, D., Ravi, V. M., Behringer, S. P., Frenking, J. H., Wurm, J., Joseph, K., Garrelfs, N. W. C., Strähle, J., Heynckes, S., Grauvogel, J., Franco, P., Mader, I., Schneider, M., Potthoff, A. L., Delev, D., Hofmann, U. G., Fung, C., Beck, J., Sankowski, R., ... Schnell, O. (2019). Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10493-6>
- Herculano-Houzel, S., Manger, P. R., & Kaas, J. H. (2014). Brain scaling in mammalian evolution as a consequence of concerted and mosaic changes in numbers of neurons and average neuronal cell size. In *Frontiers in Neuroanatomy* (Vol. 8, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00077>

- Herrmann, J. E., Imura, T., Song, B., Qi, J., Ao, Y., Nguyen, T. K., Korsak, R. A., Takeda, K., Akira, S., & Sofroniew, M. V. (2008). STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(28), 7231–7243. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1709-08.2008>
- Hickman, S. E., Allison, E. K., & El Khoury, J. (2008). Microglial dysfunction and defective β -amyloid clearance pathways in aging alzheimer's disease mice. *Journal of Neuroscience*, 28(33), 8354–8360. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0616-08.2008>
- Hill, S. J., Barbarese, E., & McIntosh, T. K. (1996). Regional heterogeneity in the response of astrocytes following traumatic brain injury in the adult rat. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 55(12), 1221–1229. <https://doi.org/10.1097/00005072-199612000-00005>
- Hirbec, H., Déglon, N., Foo, L. C., Goshen, I., Grutzendler, J., Hangen, E., Kreisel, T., Linck, N., Muffat, J., Regio, S., Rion, S., & Escartin, C. (2020). Emerging technologies to study glial cells. In *GLIA*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/glia.23780>
- Hirbec, H., Rassendren, F., & Audinat, E. (2019). Microglia Reactivity: Heterogeneous Pathological Phenotypes. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2034, pp. 41–55). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9658-2_4
- Hochstim, C., Deneen, B., Lukaszewicz, A., Zhou, Q., & Anderson, D. J. (2008). Identification of Positionally Distinct Astrocyte Subtypes whose Identities Are Specified by a Homeodomain Code. *Cell*, 133(3), 510–522. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.046>
- Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J., & Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. In *Genes and Development* (Vol. 17, Issue 18, pp. 2205–2232). Genes Dev. <https://doi.org/10.1101/gad.1102703>
- Höke, A., Canning, D. R., Malemud, C. J., & Silver, J. (1994). Regional differences in reactive gliosis induced by substrate-bound β -amyloid. *Experimental Neurology*, 130(1), 56–66. <https://doi.org/10.1006/exnr.1994.1185>
- Hol, E. M., & Pekny, M. (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology*, 32, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.004>
- Hölter, S. M., Garrett, L., Einicke, J., Sperling, B., Dirscherl, P., Zimprich, A., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Hrabě de Angelis, M., & Wurst, W. (2015). Assessing Cognition in Mice. *Current Protocols in Mouse Biology*, 5(4), 331–358. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo150068>
- Hong, L., Huang, H. C., & Jiang, Z. F. (2014). Relationship between amyloid-beta and the ubiquitin-proteasome system in alzheimer's disease. In *Neurological Research* (Vol. 36, Issue 3, pp. 276–282). Neurol Res. <https://doi.org/10.1179/1743132813Y.0000000288>
- Hong, S., & Stevens, B. (2016). Microglia: Phagocytosing to Clear, Sculpt, and Eliminate. In *Developmental Cell* (Vol. 38, Issue 2, pp. 126–128). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.07.006>
- Hottinger, A. F., Azzouz, M., Deglon, N., Aebischer, P., & Zurn, A. D. (2000). Complete and long-term rescue of lesioned adult motoneurons by lentiviral-mediated expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the facial nucleus. *Journal of Neuroscience*, 20(15), 5587–5593.

- <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-15-05587.2000>
- Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S. G., Croteau, D. L., & Bohr, V. A. (2019). Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 15, Issue 10, pp. 565–581). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/s41582-019-0244-7>
- Houades, V., Koulakoff, A., Ezan, P., Seif, I., & Giaume, C. (2008). Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *Journal of Neuroscience*, 28(20), 5207–5217. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5100-07.2008>
- Huang, Y. W. A., Zhou, B., Wernig, M., & Südhof, T. C. (2017). ApoE2, ApoE3, and ApoE4 Differentially Stimulate APP Transcription and A β Secretion. *Cell*, 168(3), 427–441.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.044>
- Hung, C. C., Lin, C. H., Chang, H., Wang, C. Y., Lin, S. H., Hsu, P. C., Sun, Y. Y., Lin, T. N., Shie, F. S., Kao, L. Sen, Chou, C. M., & Lee, Y. H. (2016). Astrocytic GAP43 induced by the TLR4/NF- κ B/STAT3 axis attenuates astrogliosis-mediated microglial activation and neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*, 36(6), 2027–2043. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3457-15.2016>
- Huynh, T. P. V., Davis, A. A., Ulrich, J. D., & Holtzman, D. M. (2017). Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: The influence of apolipoprotein E on amyloid- β and other amyloidogenic proteins. In *Journal of Lipid Research* (Vol. 58, Issue 5, pp. 824–836). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1194/jlr.R075481>
- Ikonomovic, M. D., Abrahamson, E. E., Price, J. C., Hamilton, R. L., Mathis, C. A., Paljug, W. R., Debnath, M. L., Cohen, A. D., Mizukami, K., DeKosky, S. T., Lopez, O. L., & Klunk, W. E. (2012). Early AD pathology in a [C-11]PiB-negative case: a PiB-amyloid imaging, biochemical, and immunohistochemical study. *Acta Neuropathologica*, 123(3), 433–447. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-0943-2>
- Itoh, N., Itoh, Y., Tassoni, A., Ren, E., Kaito, M., Ohno, A., Ao, Y., Farkhondeh, V., Johnsonbaugh, H., Burda, J., Sofroniew, M. V., & Voskuhl, R. R. (2018). Cell-specific and region-specific transcriptomics in the multiple sclerosis model: Focus on astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(2), E302–E309. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716032115>
- Jackson, R. J., Rudinskiy, N., Herrmann, A. G., Croft, S., Kim, J. S. M., Petrova, V., Ramos-Rodriguez, J. J., Pitstick, R., Wegmann, S., Garcia-Alloza, M., Carlson, G. A., Hyman, B. T., & Spires-Jones, T. L. (2016). Human tau increases amyloid β plaque size but not amyloid β -mediated synapse loss in a novel mouse model of Alzheimer's disease. *European Journal of Neuroscience*, 44(12), 3056–3066. <https://doi.org/10.1111/ejn.13442>
- Jankowsky, J. L., Fadale, D. J., Anderson, J., Xu, G. M., Gonzales, V., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Lee, M. K., Younkin, L. H., Wagner, S. L., Younkin, S. G., & Borchelt, D. R. (2004a). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide in vivo: Evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase. *Human Molecular Genetics*, 13(2), 159–170. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh019>
- Jankowsky, J. L., Fadale, D. J., Anderson, J., Xu, G. M., Gonzales, V., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Lee, M. K., Younkin, L. H., Wagner, S. L., Younkin, S. G., & Borchelt, D. R. (2004b). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide in vivo: Evidence for augmentation of a 42-specific γ

- secretase. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 13, Issue 2, pp. 159–170).
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddh019>
- Jankowsky, J. L., Slunt, H. H., Gonzales, V., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., & Borchelt, D. R. (2004). APP processing and amyloid deposition in mice haplo-insufficient for presenilin 1. *Neurobiology of Aging*, 25(7), 885–892.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.09.008>
- Jankowsky, J. L., & Zheng, H. (2017). Practical considerations for choosing a mouse model of Alzheimer's disease. In *Molecular Neurodegeneration* (Vol. 12, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0231-7>
- Jansen, A. H. P., Reits, E. A. J., & Hol, E. M. (2014). The ubiquitin proteasome system in glia and its role in neurodegenerative diseases. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 7, Issue AUG). Frontiers Research Foundation.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00073>
- Jayakumar, A. R., Tong, X. Y., Ruiz-Cordero, R., Bregy, A., Bethea, J. R., Bramlett, H. M., & Norenberg, M. D. (2014). Activation of NF- κ B mediates astrocyte swelling and brain edema in traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 31(14), 1249–1257. <https://doi.org/10.1089/neu.2013.3169>
- Jessell, T. M. (2000). Neuronal specification in the spinal cord: Inductive signals and transcriptional codes. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 1, Issue 1, pp. 20–29). European Association for Cardio-Thoracic Surgery.
<https://doi.org/10.1038/35049541>
- Jiang, S., & Bhaskar, K. (2017). Dynamics of the Complement, Cytokine, and Chemokine Systems in the Regulation of Synaptic Function and Dysfunction Relevant to Alzheimer's Disease. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 57, Issue 4, pp. 1123–1135). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-161123>
- Jo, S., Yarishkin, O., Hwang, Y. J., Chun, Y. E., Park, M., Woo, D. H., Bae, J. Y., Kim, T., Lee, J., Chun, H., Park, H. J., Lee, D. Y., Hong, J., Kim, H. Y., Oh, S. J., Park, S. J., Lee, H., Yoon, B. E., Kim, Y., ... Lee, C. J. (2014). GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. In *Nature Medicine* (Vol. 20, Issue 8, pp. 886–896). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/nm.3639>
- John Lin, C. C., Yu, K., Hatcher, A., Huang, T. W., Lee, H. K., Carlson, J., Weston, M. C., Chen, F., Zhang, Y., Zhu, W., Mohila, C. A., Ahmed, N., Patel, A. J., Arenkiel, B. R., Noebels, J. L., Creighton, C. J., & Deneen, B. (2017). Identification of diverse astrocyte populations and their malignant analogs. *Nature Neuroscience*, 20(3), 396–405. <https://doi.org/10.1038/nn.4493>
- Jung, E. S., An, K., Hong, H. S., Kim, J. H., & Mook-Jung, I. (2012). Astrocyte-originated ATP protects A β 1–42-induced impairment of synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience*, 32(9), 3081–3087. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6357-11.2012>
- Kaltschmidt, B., Uherek, M., Volk, B., Baeuerle, P. A., & Kaltschmidt, C. (1997). Transcription factor NF- κ B is activated in primary neurons by amyloid β peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(6), 2642–2647. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2642>
- Kaltschmidt, B., Widera, D., & Kaltschmidt, C. (2005). Signaling via NF- κ B in the nervous system. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1745, Issue 3, pp. 287–299). Biochim Biophys Acta.

- <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.05.009>
- Kamphuis, W., Kooijman, L., Orre, M., Stassen, O., Pekny, M., & Hol, E. M. (2015). GFAP and vimentin deficiency alters gene expression in astrocytes and microglia in wild-type mice and changes the transcriptional response of reactive glia in mouse model for Alzheimer's disease. *GLIA*, 63(6), 1036–1056. <https://doi.org/10.1002/glia.22800>
- Kang, W., Balordi, F., Su, N., Chen, L., Fishell, G., & Hébert, J. M. (2014). Astrocyte activation is suppressed in both normal and injured brain by FGF signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(29), E2987–95. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320401111>
- Kang, W., & Hébert, J. M. (2011). Signaling pathways in reactive astrocytes, a genetic perspective. In *Molecular Neurobiology* (Vol. 43, Issue 3, pp. 147–154). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12035-011-8163-7>
- Kelley, K. W., Ben Haim, L., Schirmer, L., Tyzack, G. E., Tolman, M., Miller, J. G., Tsai, H. H., Chang, S. M., Molofsky, A. V., Yang, Y., Patani, R., Lakatos, A., Ullian, E. M., & Rowitch, D. H. (2018). Kir4.1-Dependent Astrocyte–Fast Motor Neuron Interactions Are Required for Peak Strength. *Neuron*, 98(2), 306–319.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.03.010>
- Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T. K., David, E., Baruch, K., Lara-Astaiso, D., Toth, B., Itzkovitz, S., Colonna, M., Schwartz, M., & Amit, I. (2017). A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell*, 169(7), 1276–1290.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.018>
- Kershaw, N. J., Murphy, J. M., Lucet, I. S., Nicola, N. A., & Babon, J. J. (2013). Regulation of Janus kinases by SOCS proteins. *Biochemical Society Transactions*, 41(4), 1042–1047. <https://doi.org/10.1042/BST20130077>
- Kesanakurti, D., Chetty, C., Rajasekhar Maddirela, D., Gujrati, M., & Rao, J. S. (2013). Essential role of cooperative NF-κB and Stat3 recruitment to ICAM-1 intronic consensus elements in the regulation of radiation-induced invasion and migration in glioma. *Oncogene*, 32(43), 5144–5155. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.546>
- Khakh, B. S., & Deneen, B. (2019). The Emerging Nature of Astrocyte Diversity. *Annual Review of Neuroscience*, 42(1), 187–207. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070918-050443>
- Khakh, B. S., & Sofroniew, M. V. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nature Neuroscience*, 18(7), 942–952. <https://doi.org/10.1038/nn.4043>
- Kilgore, M., Miller, C. A., Fass, D. M., Hennig, K. M., Haggarty, S. J., Sweatt, J. D., & Rumbaugh, G. (2010). Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology*, 35(4), 870–880. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.197>
- Kim, J., Waldvogel, H. J., Faull, R. L. M., Curtis, M. A., & Nicholson, L. F. B. (2015). The RAGE receptor and its ligands are highly expressed in astrocytes in a grade-dependant manner in the striatum and subependymal layer in Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 134(5), 927–942. <https://doi.org/10.1111/jnc.13178>
- Kinchen, J. M., Cabello, J., Kilngele, D., Wong, K., Felchtinger, R., Schnabel, H., Schnabel, R., & Hengartner, M. O. (2005). Two pathways converge at CED-10 to mediate actin rearrangement and corpse removal in *C. elegans*. *Nature*, 434(7029), 93–99. <https://doi.org/10.1038/nature03263>

- Kisler, K., Nelson, A. R., Montagne, A., & Zlokovic, B. V. (2017). Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 18, Issue 7, pp. 419–434). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.48>
- Kobayashi, E., Nakano, M., Kubota, K., Himuro, N., Mizoguchi, S., Chikenji, T., Otani, M., Mizue, Y., Nagaishi, K., & Fujimiya, M. (2018). Activated forms of astrocytes with higher GLT-1 expression are associated with cognitive normal subjects with Alzheimer pathology in human brain. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19442-7>
- Koistinaho, M., Kettunen, M. I., Goldsteins, G., Keinänen, R., Salminen, A., Ort, M., Bures, J., Liu, D., Kauppinen, R. A., Higgins, L. S., & Koistinaho, J. (2002). β -amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse A β deposits but do not form plaques show increased ischemic vulnerability: Role of inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(3), 1610–1615. <https://doi.org/10.1073/pnas.032670899>
- Koistinaho, M., Lin, S., Wu, X., Esterman, M., Koger, D., Hanson, J., Higgs, R., Liu, F., Malkani, S., Bales, K. R., & Paul, S. M. (2004). Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid- β peptides. *Nature Medicine*, 10(7), 719–726. <https://doi.org/10.1038/nm1058>
- Kraeuter, A. K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019). The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1916, pp. 105–111). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_10
- Kraft, A. W., Hu, X., Yoon, H., Yan, P., Xiao, Q., Wang, Y., Gil, S. C., Brown, J., Wilhelmsson, U., Restivo, J. L., Cirrito, J. R., Holtzman, D. M., Kim, J., Pekny, M., & Lee, J. M. (2013). Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. *FASEB Journal*, 27(1), 187–198. <https://doi.org/10.1096/fj.12-208660>
- Krencik, R., Weick, J. P., Liu, Y., Zhang, Z. J., & Zhang, S. C. (2011). Specification of transplantable astroglial subtypes from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 29(6), 528–534. <https://doi.org/10.1038/nbt.1877>
- Kucheryavykh, Y. V., Kucheryavykh, L. Y., Nichols, C. G., Maldonado, H. M., Baksi, K., Reichenbach, A., Skatchkov, S. N., & Eaton, M. J. (2007). Downregulation of Kir4.1 inward rectifying potassium channel subunits by RNAi impairs potassium transfer and glutamate uptake by cultured cortical astrocytes. *GLIA*, 55(3), 274–281. <https://doi.org/10.1002/glia.20455>
- Kuchibhotla, K. V., Lattarulo, C. R., Hyman, B. T., & Bacskaï, B. J. (2009). Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice. *Science*, 323(5918), 1211–1215. <https://doi.org/10.1126/science.1169096>
- Lagos-Cabré, R., Alvarez, A., Kong, M., Burgos-Bravo, F., Cárdenas, A., Rojas-Mancilla, E., Pérez-Núñez, R., Herrera-Molina, R., Rojas, F., Schneider, P., Herrera-Marschitz, M., Quest, A. F. G., van Zundert, B., & Leyton, L. (2017). α V β 3 Integrin regulates astrocyte reactivity. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0968-5>
- Lake, B. B., Chen, S., Sos, B. C., Fan, J., Kaeser, G. E., Yung, Y. C., Duong, T. E., Gao, D., Chun, J., Kharchenko, P. V., & Zhang, K. (2018). Integrative single-cell analysis of transcriptional and epigenetic states in the human adult brain. *Nature Biotechnology*, 36(1), 70–80. <https://doi.org/10.1038/nbt.4038>

- Lanjakornsiripan, D., Pior, B. J., Kawaguchi, D., Furutachi, S., Tahara, T., Katsuyama, Y., Suzuki, Y., Fukazawa, Y., & Gotoh, Y. (2018). Layer-specific morphological and molecular differences in neocortical astrocytes and their dependence on neuronal layers. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03940-3>
- Lavis, S., Guillermier, M., Hérard, A. S., Petit, F., Delahaye, M., Van Camp, N. V., Haim, L. Ben, Lebon, V., Remy, P., Dollé, F., Delzescaux, T., Bonvento, G., Hantraye, P., & Escartin, C. (2012). Reactive astrocytes overexpress TSPO and are detected by TSPO positron emission tomography imaging. *Journal of Neuroscience*, 32(32), 10809–10818. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1487-12.2012>
- Le Douce, J., Maugard, M., Veran, J., Matos, M., Jégo, P., Vigneron, P. A., Faivre, E., Toussay, X., Vandenberghe, M., Balbastre, Y., Piquet, J., Guiot, E., Tran, N. T., Taverna, M., Marinesco, S., Koyanagi, A., Furuya, S., Gaudin-Guérif, M., Goutal, S., ... Bonvento, G. (2020). Impairment of Glycolysis-Derived L-Serine Production in Astrocytes Contributes to Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease. *Cell Metabolism*, 31(3), 503–517.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.02.004>
- Le Prince, G., Delaere, P., Fages, C., Lefrançois, T., Touret, M., Salanon, M., & Tardy, M. (1995). Glutamine synthetase (GS) expression is reduced in senile dementia of the Alzheimer type. *Neurochemical Research*, 20(7), 859–862. <https://doi.org/10.1007/BF00969698>
- LeCompte, M. D., Shimada, I. S., Sherwin, C., & Spees, J. L. (2015). Notch1-STAT3-ETBR signaling axis controls reactive astrocyte proliferation after brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(28), 8726–8731. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501029112>
- Lee, C. Y. D., & Landreth, G. E. (2010). The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. In *Journal of Neural Transmission* (Vol. 117, Issue 8, pp. 949–960). J Neural Transm (Vienna). <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0433-4>
- Lee, E., & Chung, W. S. (2019). Glial control of synapse number in healthy and diseased brain. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 13, p. 42). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00042>
- Lepore, A. C., Dejea, C., Carmen, J., Rauck, B., Kerr, D. A., Sofroniew, M. V., & Maragakis, N. J. (2008). Selective ablation of proliferating astrocytes does not affect disease outcome in either acute or chronic models of motor neuron degeneration. *Experimental Neurology*, 211(2), 423–432. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.02.020>
- Li, H., Rao, A., & Hogan, P. G. (2011). Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 21, Issue 2, pp. 91–103). Trends Cell Biol. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.09.011>
- Li, Q., Liu, Y., & Sun, M. (2017). Autophagy and Alzheimer's Disease. In *Cellular and Molecular Neurobiology* (Vol. 37, Issue 3, pp. 377–388). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0386-8>
- Li, X., Tao, Y., Bradley, R., Du, Z., Tao, Y., Kong, L., Dong, Y., Jones, J., Yan, Y., Harder, C. R. K., Friedman, L. M., Bilal, M., Hoffmann, B., & Zhang, S. C. (2018). Fast Generation of Functional Subtype Astrocytes from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 11(4), 998–1008. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.08.019>
- Li, Y., Du, X. F., Liu, C. S., Wen, Z. L., & Du, J. L. (2012). Reciprocal Regulation between Resting Microglial Dynamics and Neuronal Activity In Vivo. *Developmental Cell*, 23(6), 1189–1202. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.10.027>

- Lian, H., Litvinchuk, A., Chiang, A. C. A., Aithmitti, N., Jankowsky, J. L., & Zheng, H. (2016a). Astrocyte-microglia cross talk through complement activation modulates amyloid pathology in mouse models of alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 36(2), 577–589. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2117-15.2016>
- Lian, H., Yang, L., Cole, A., Sun, L., Chiang, A. C.-A., Fowler, S. W., Shim, D. J., Rodriguez-Rivera, J., Taglialatela, G., Jankowsky, J. L., Lu, H.-C., & Zheng, H. (2015). NFκB-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease. *Neuron*, 85(1), 101–115. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.11.018>
- Lian, H., & Zheng, H. (2016b). Signaling pathways regulating neuron-glia interaction and their implications in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 136(3), 475–491. <https://doi.org/10.1111/jnc.13424>
- Liddel, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. In *Immunity* (Vol. 46, Issue 6, pp. 957–967). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>
- Liddel, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Liebner, S., Dijkhuizen, R. M., Reiss, Y., Plate, K. H., Agalliu, D., & Constantin, G. (2018). Functional morphology of the blood–brain barrier in health and disease. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 135, Issue 3, pp. 311–336). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1815-1>
- Lim, C. P., Phan, T. T., Lim, I. J., & Cao, X. (2006). Stat3 contributes to keloid pathogenesis via promoting collagen production, cell proliferation and migration. *Oncogene*, 25(39), 5416–5425. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209531>
- Lin, Y. T., Seo, J., Gao, F., Feldman, H. M., Wen, H. L., Penney, J., Cam, H. P., Gjoneska, E., Raja, W. K., Cheng, J., Rueda, R., Kritskiy, O., Abdurrob, F., Peng, Z., Milo, B., Yu, C. J., Elmsaouri, S., Dey, D., Ko, T., ... Tsai, L. H. (2018). APOE4 Causes Widespread Molecular and Cellular Alterations Associated with Alzheimer's Disease Phenotypes in Human iPSC-Derived Brain Cell Types. *Neuron*, 98(6), 1141–1154.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.05.008>
- Litvinchuk, A., Wan, Y. W., Swartzlander, D. B., Chen, F., Cole, A., Propson, N. E., 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(6), 1337–1353.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.031>
- López-Hidalgo, M., Hoover, W. B., & Schummers, J. (2016). Spatial organization of astrocytes in ferret visual cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 524(17), 3561–3576. <https://doi.org/10.1002/cne.24015>
- Loulier, K., Barry, R., Mahou, P., Franc, Y. Le, Supatto, W., Matho, K. S., Ieng, S., Fouquet, S., Dupin, E., Benosman, R., Chédotal, A., Beaurepaire, E., Morin, X., & Livet, J. (2014). Multiplex Cell and Lineage Tracking with Combinatorial Labels. *Neuron*, 81(3), 505–520. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.016>
- Lu, J. Q., Power, C., Blevins, G., Giuliani, F., & Wee Yong, V. (2013). The regulation of reactive changes around multiple sclerosis lesions by phosphorylated signal

- transducer and activator of transcription. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 72(12), 1135–1144. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000011>
- Luna-Munoz, J., R., C., M., C., Flores-Rodriguez, P., Avila, J., R., S., la Cruz, F. De, Mena, R., A., M., & Floran-Garduno, B. (2013). Phosphorylation of Tau Protein Associated as a Protective Mechanism in the Presence of Toxic, C-Terminally Truncated Tau in Alzheimer's Disease. In *Understanding Alzheimer's Disease*. InTech. <https://doi.org/10.5772/54228>
- Lundgaard, I., Li, B., Xie, L., Kang, H., Sanggaard, S., Haswell, J. D. R., Sun, W., Goldman, S., Blekot, S., Nielsen, M., Takano, T., Deane, R., & Nedergaard, M. (2015). Direct neuronal glucose uptake heralds activity-dependent increases in cerebral metabolism. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7807>
- Ma, J. F., Huang, Y., Chen, S. D., & Halliday, G. (2010). Immunohistochemical evidence for macroautophagy in neurones and endothelial cells in Alzheimer's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 36(4), 312–319. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2010.01067.x>
- Macvicar, B. A., & Newman, E. A. (2015). Astrocyte regulation of blood flow in the brain. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(5), 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020388>
- Magistretti, P. J. (2006). Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. In *Journal of Experimental Biology* (Vol. 209, Issue 12, pp. 2304–2311). <https://doi.org/10.1242/jeb.02208>
- Magistretti, P. J., & Allaman, I. (2015). A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging. In *Neuron* (Vol. 86, Issue 4, pp. 883–901). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.035>
- Makarava, N., Chang, J. C. Y., Kushwaha, R., & Baskakov, I. V. (2019). Region-Specific Response of Astrocytes to Prion Infection. *Frontiers in Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01048>
- Makin, S. (2018). The amyloid hypothesis on trial. *Nature*, 559(7715), S4–S7. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-05719-4>
- Mantzavinos, V., & Alexiou, A. (2017). Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis. *Current Alzheimer Research*, 14(11). <https://doi.org/10.2174/1567205014666170203125942>
- Marion-Poll, L., Montalban, E., Munier, A., Hervé, D., & Girault, J. A. (2014). Fluorescence-activated sorting of fixed nuclei: A general method for studying nuclei from specific cell populations that preserves post-translational modifications. *European Journal of Neuroscience*, 39(7), 1234–1244. <https://doi.org/10.1111/ejn.12506>
- Martín-López, E., García-Marques, J., Núñez-Llaves, R., & López-Mascaraque, L. (2013). Clonal Astrocytic Response to Cortical Injury. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074039>
- Martín, R., Bajo-Grañeras, R., Moratalla, R., Perea, G., & Araque, A. (2015). Circuit-specific signaling in astrocyte-neuron networks in basal ganglia pathways. *Science*, 349(6249), 730–734. <https://doi.org/10.1126/science.aaa7945>
- Masgrau, R., Guaza, C., Ransohoff, R. M., & Galea, E. (2017). Should We Stop Saying 'Glia' and 'Neuroinflammation'? In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 23, Issue 6, pp. 486–500). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.04.005>
- Masliyah, E., Alford, M., DeTeresa, R., Mallory, M., & Hansen, L. (1996). Deficient

- glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 40(5), 759–766. <https://doi.org/10.1002/ana.410400512>
- Masliah, Eliezer, Alford, M., Mallory, M., Rockenstein, E., Moechars, D., & Van Leuven, F. (2000). Abnormal glutamate transport function in mutant amyloid precursor protein transgenic mice. *Experimental Neurology*, 163(2), 381–387. <https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7386>
- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.56>
- Mathys, H., Adaikkan, C., Gao, F., Young, J. Z., Manet, E., Hemberg, M., De Jager, P. L., Ransohoff, R. M., Regev, A., & Tsai, L. H. (2017). Temporal Tracking of Microglia Activation in Neurodegeneration at Single-Cell Resolution. *Cell Reports*, 21(2), 366–380. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.039>
- Mathys, H., Davila-Velderrain, J., Peng, Z., Gao, F., Mohammadi, S., Young, J. Z., Menon, M., He, L., Abdurrob, F., Jiang, X., Martorell, A. J., Ransohoff, R. M., Hafler, B. P., Bennett, D. A., Kellis, M., & Tsai, L. H. (2019). Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease. *Nature*, 570(7761), 332–337. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1195-2>
- Matias, I., Morgado, J., & Gomes, F. C. A. (2019). Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00059>
- Mattsson-Carlsson, N., Andersson, E., Janelidze, S., Ossenkoppele, R., Insel, P., Strandberg, O., Zetterberg, H., Rosen, H. J., Rabinovici, G., Chai, X., Blennow, K., Dage, J. L., Stomrud, E., Smith, R., Palmqvist, S., & Hansson, O. (2020). A β deposition is associated with increases in soluble and phosphorylated tau that precede a positive Tau PET in Alzheimer's disease. *Science Advances*, 6(16). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz2387>
- Mattugini, N., Merl-Pham, J., Petrozziello, E., Schindler, L., Bernhagen, J., Hauck, S. M., & Götz, M. (2018). Influence of white matter injury on gray matter reactive gliosis upon stab wound in the adult murine cerebral cortex. *GLIA*, 66(8), 1644–1662. <https://doi.org/10.1002/glia.23329>
- Medeiros, R., & LaFerla, F. M. (2013). Astrocytes: Conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. In *Experimental Neurology* (Vol. 239, Issue 1, pp. 133–138). Exp Neurol. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.10.007>
- Mei, X., Ezan, P., Giaume, C., & Koulakoff, A. (2010). Astroglial connexin immunoreactivity is specifically altered at β -amyloid plaques in β -amyloid precursor protein/presenilin1 mice. *Neuroscience*, 171(1), 92–105. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.08.001>
- Merkle, F. T., Fuentealba, Luis C., Kessaris, N., & Alvarez-Buylla, A. (2014). Previously Unknown Interneuron Types. *Nature Neuroscience*, 17(2), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nn.3610>. Adult
- Merkle, F. T., Mirzadeh, Z., & Alvarez-Buylla, A. (2007). Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science*, 317(5836), 381–384. <https://doi.org/10.1126/science.1144914>
- Mertens, C., & Darnell, J. E. (2007). SnapShot: JAK-STAT Signaling. In *Cell* (Vol. 131, Issue 3). Cell. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.033>
- Miller, S. J. (2018). Astrocyte heterogeneity in the adult central nervous system. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 12). Frontiers Media S.A.

- <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00401>
- Mincheva-Tasheva, S., & Soler, R. M. (2013). NF- κ B signaling pathways: Role in nervous system physiology and pathology. In *Neuroscientist* (Vol. 19, Issue 2, pp. 175–194). Neuroscientist. <https://doi.org/10.1177/1073858412444007>
- Miyamoto, N., Magami, S., Inaba, T., Ueno, Y., Hira, K., Kijima, C., Nakajima, S., Yamashiro, K., Urabe, T., & Hattori, N. (2020). The effects of A1/A2 astrocytes on oligodendrocyte lineage cells against white matter injury under prolonged cerebral hypoperfusion. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.23814>
- Moeendarbary, E., Weber, I. P., Sheridan, G. K., Koser, D. E., Soleman, S., Haenzi, B., Bradbury, E. J., Fawcett, J., & Franze, K. (2017). The soft mechanical signature of glial scars in the central nervous system. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14787>
- Mohammad Abdul, H., Baig, I., LeVine, H., Guttmann, R. P., & Norris, C. M. (2011). Proteolysis of calcineurin is increased in human hippocampus during mild cognitive impairment and is stimulated by oligomeric Abeta in primary cell culture. *Aging Cell*, 10(1), 103–113. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00645.x>
- Molofsky, A. V., Krenick, R., Ullian, E., Tsai, H. -h., Deneen, B., Richardson, W. D., Barres, B. A., & Rowitch, D. H. (2012). Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes & Development*, 26(9), 891–907. <https://doi.org/10.1101/gad.188326.112>
- Molofsky, Anna V., Kelley, K. W., Tsai, H. H., Redmond, S. A., Chang, S. M., Madireddy, L., Chan, J. R., Baranzini, S. E., Ullian, E. M., & Rowitch, D. H. (2014). Astrocyte-encoded positional cues maintain sensorimotor circuit integrity. *Nature*, 509(7499), 189–194. <https://doi.org/10.1038/nature13161>
- Morel, L., Chiang, M. S. R., Higashimori, H., Shoneye, T., Iyer, L. K., Yelick, J., Tai, A., & Yang, Y. (2017). Molecular and functional properties of regional astrocytes in the adult brain. *Journal of Neuroscience*, 37(36), 8706–8717. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3956-16.2017>
- Morel, L., Men, Y., Chiang, M. S. R., Tian, Y., Jin, S., Yelick, J., Higashimori, H., & Yang, Y. (2019). Intracortical astrocyte subpopulations defined by astrocyte reporter Mice in the adult brain. *GLIA*, 67(1), 171–181. <https://doi.org/10.1002/glia.23545>
- Morgan, B. P. (2018). Complement in the pathogenesis of Alzheimer's disease. In *Seminars in Immunopathology* (Vol. 40, Issue 1, pp. 113–124). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0662-9>
- Morgan, D. (2011). Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Journal of Internal Medicine*, 269(1), 54–63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2010.02315.x>
- Moser, E., Moser, M. B., & Andersen, P. (1993). Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *Journal of Neuroscience*, 13(9), 3916–3925. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.13-09-03916.1993>
- Muroyama, Y., Fujiwara, Y., Orkin, S. H., & Rowitch, D. H. (2005). Specification of astrocytes by bHLH protein SCL in a restricted region of the neural tube. *Nature*, 438(7066), 360–363. <https://doi.org/10.1038/nature04139>
- Myelin Phagocytosis by Astrocytes After Myelin Damage Promotes Lesion Pathology* - PubMed. (n.d.). Retrieved May 23, 2020, from https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28007993/?from_single_result=Myelin+phagocytosis+by+astrocytes+after+myelin+damage+promotes+lesion+pathology.+B&expanded_search_query=Myelin+phagocytosis+by+astrocytes+after+myelin+damage+promotes+

lesion+pathology.+B

- Nagy, J. I., Li, W., Hertzberg, E. L., & Marotta, C. A. (1996). Elevated connexin43 immunoreactivity at sites of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Brain Research*, 717(1–2), 173–178. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01526-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01526-4)
- Narayan, P., Holmström, K. M., Kim, D. H., Whitcomb, D. J., Wilson, M. R., St. George-Hyslop, P., Wood, N. W., Dobson, C. M., Cho, K., Abramov, A. Y., & Klenerman, D. (2014). Rare individual amyloid- β oligomers act on astrocytes to initiate neuronal damage. *Biochemistry*, 53(15), 2442–2453. <https://doi.org/10.1021/bi401606f>
- Neal, M., Luo, J., Harischandra, D. S., Gordon, R., Sarkar, S., Jin, H., Anantharam, V., Désaubry, L., Kanthasamy, A., & Kanthasamy, A. (2018). Prokineticin-2 promotes chemotaxis and alternative A2 reactivity of astrocytes. *GLIA*, 66(10), 2137–2157. <https://doi.org/10.1002/glia.23467>
- Nedergaard, M., Ransom, B., & Goldman, S. A. (2003). New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 26, Issue 10, pp. 523–530). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.08.008>
- Nimmerjahn, A., Mukamel, E. A., & Schnitzer, M. J. (2009). Motor Behavior Activates Bergmann Glial Networks. *Neuron*, 62(3), 400–412. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.03.019>
- Norris, C. M., Kadish, I., Blalock, E. M., Chen, K. C., Thibault, V., Porter, N. M., Landfield, P. W., & Kraner, S. D. (2005). Calcineurin triggers reactive/inflammatory processes in astrocytes and is upregulated in aging and Alzheimer's models. *Journal of Neuroscience*, 25(18), 4649–4658. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0365-05.2005>
- Nwaobi, S. E., Cuddapah, V. A., Patterson, K. C., Randolph, A. C., & Olsen, M. L. (2016). The role of glial-specific Kir4.1 in normal and pathological states of the CNS. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 132, Issue 1). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1553-1>
- Oberheim, N. A., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2012). Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods in Molecular Biology*, 814, 23–45. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0_3
- Oberheim, N. A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J. H. C., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J. D., Pilcher, W., Ojemann, J. G., Ransom, B. R., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2009). Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 29(10), 3276–3287. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4707-08.2009>
- Oberheim, N. A., Tian, G. F., Han, X., Peng, W., Takano, T., Ransom, B., & Nedergaard, M. (2008). Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain. *Journal of Neuroscience*, 28(13), 3264–3276. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4980-07.2008>
- Oberstein, T. J., Spitzer, P., Klafki, H. W., Linning, P., Neff, F., Knölker, H. J., Lewczuk, P., Wiltfang, J., Kornhuber, J., & Maler, J. M. (2015). Astrocytes and microglia but not neurons preferentially generate N-terminally truncated A β peptides. *Neurobiology of Disease*, 73, 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.08.031>
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., & Laferla, F. M. (2003). Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A

- and Synaptic Dysfunction. In *Neuron* (Vol. 39).
- Oeckinghaus, A., Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2011). Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. In *Nature Immunology* (Vol. 12, Issue 8, pp. 695–708). Nat Immunol. <https://doi.org/10.1038/ni.2065>
- Ohgomori, T., Yamasaki, R., Takeuchi, H., Kadomatsu, K., Kira, J. I., & Jinno, S. (2017). Differential activation of neuronal and glial STAT3 in the spinal cord of the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neuroscience*, 46(4), 2001–2014. <https://doi.org/10.1111/ejn.13650>
- Olabarria, M., Noristani, H. N., Verkhratsky, A., & Rodríguez, J. J. (2010). Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *GLIA*, 58(7), 831–838. <https://doi.org/10.1002/glia.20967>
- Olabarria, M., Noristani, H. N., Verkhratsky, A., & Rodríguez, J. J. (2011). Age-dependent decrease in glutamine synthetase expression in the hippocampal astroglia of the triple transgenic Alzheimer's disease mouse model: Mechanism for deficient glutamatergic transmission? *Molecular Neurodegeneration*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-55>
- Oliva, A. A., Kang, Y., Sanchez-Molano, J., Furones, C., & Atkins, C. M. (2012). STAT3 signaling after traumatic brain injury. *Journal of Neurochemistry*, 120(5), 710–720. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07610.x>
- Olsen, M. L., Campbell, S. L., & Sontheimer, H. (2007). Differential distribution of Kir4.1 in spinal cord astrocytes suggests regional differences in K⁺ homeostasis. *Journal of Neurophysiology*, 98(2), 786–793. <https://doi.org/10.1152/jn.00340.2007>
- Olsen, Michelle L., Khakh, B. S., Skatchkov, S. N., Zhou, M., Lee, C. J., & Rouach, N. (2015). New insights on astrocyte ion channels: Critical for homeostasis and neuron-glia signaling. *Journal of Neuroscience*, 35(41), 13827–13835. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2603-15.2015>
- Olsson, B., Lautner, R., Andreasson, U., Öhrfelt, A., Portelius, E., Bjerke, M., Hölttä, M., Rosén, C., Olsson, C., Strobel, G., Wu, E., Dakin, K., Petzold, M., Blennow, K., & Zetterberg, H. (2016). CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Neurology*, 15(7), 673–684. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00070-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00070-3)
- Orellana, J. A., Froger, N., Ezan, P., Jiang, J. X., Bennett, M. V. L., Naus, C. C., Giaume, C., & Sáez, J. C. (2011). ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *Journal of Neurochemistry*, 118(5), 826–840. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07210.x>
- Orre, M., Kamphuis, W., Osborn, L. M., Jansen, A. H. P., Kooijman, L., Bossers, K., & Hol, E. M. (2014a). Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiology of Aging*, 35(12), 2746–2760. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.06.004>
- Orre, M., Kamphuis, W., Osborn, L. M., Melief, J., Kooijman, L., Huitinga, I., Klooster, J., Bossers, K., & Hol, E. M. (2014b). Acute isolation and transcriptome characterization of cortical astrocytes and microglia from young and aged mice. *Neurobiology of Aging*, 35(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.07.008>
- Ortinski, P. I., Dong, J., Mungenast, A., Yue, C., Takano, H., Watson, D. J., Haydon, P. G., & Coulter, D. A. (2010a). Selective induction of astrocytic gliosis generates deficits in neuronal inhibition. *Nature Neuroscience*, 13(5), 584–591.

- <https://doi.org/10.1038/nn.2535>
- Ortinski, P. I., Dong, J., Mungenast, A., Yue, C., Takano, H., Watson, D. J., Haydon, P. G., & Coulter, D. A. (2010b). Selective induction of astrocytic gliosis generates deficits in neuronal inhibition. *Nature Neuroscience*, 13(5), 584–591.
<https://doi.org/10.1038/nn.2535>
- Osborn, L. M., Kamphuis, W., Wadman, W. J., & Hol, E. M. (2016). Astroglia: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 144, pp. 121–141). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.01.001>
- Ou, Y. N., Xu, W., Li, J. Q., Guo, Y., Cui, M., Chen, K. L., Huang, Y. Y., Dong, Q., Tan, L., & Yu, J. T. (2019). FDG-PET as an independent biomarker for Alzheimer's biological diagnosis: A longitudinal study. *Alzheimer's Research and Therapy*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13195-019-0512-1>
- Ouali Alami, N., Schurr, C., Olde Heuvel, F., Tang, L., Li, Q., Tasdogan, A., Kimbara, A., Nettekoven, M., Ottaviani, G., Raposo, C., Röver, S., Rogers-Evans, M., Rothenhäusler, B., Ullmer, C., Fingerle, J., Grether, U., Knuesel, I., Boeckers, T. M., Ludolph, A., ... Baumann, B. (2018). NF-κB activation in astrocytes drives a stage-specific beneficial neuroimmunological response in ALS. *The EMBO Journal*, 37(16). <https://doi.org/10.15252/embj.201798697>
- Palmqvist, S., Zetterberg, H., Mattsson, N., Johansson, P., Minthon, L., Blennow, K., Olsson, M., & Hansson, O. (2015). Detailed comparison of amyloid PET and CSF biomarkers for identifying early Alzheimer disease. *Neurology*, 85(14), 1240–1249.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001991>
- Panatier, A., Vallée, J., Haber, M., Murai, K. K., Lacaille, J. C., & Robitaille, R. (2011). Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell*, 146(5), 785–798. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.022>
- Pannasch, U., Freche, D., Dallérac, G., Ghézali, G., Escartin, C., Ezan, P., Cohen-Salmon, M., Benchenane, K., Abudara, V., Dufour, A., Lübke, J. H. R., Déglon, N., Knott, G., Holcman, D., & Rouach, N. (2014). Connexin 30 sets synaptic strength by controlling astroglial synapse invasion. *Nature Neuroscience*, 17(4), 549–558. <https://doi.org/10.1038/nn.3662>
- Pannasch, U., & Rouach, N. (2013). Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior. *Trends in Neurosciences*, 36(7), 405–417. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.04.004>
- Pardossi-Piquard, R., Lauritzen, I., Bauer, C., Sacco, G., Robert, P., & Checler, F. (2016). Influence of Genetic Background on Apathy-Like Behavior in Triple Transgenic AD Mice. *Current Alzheimer Research*, 13(8), 942–949.
<https://doi.org/10.2174/1567205013666160404120106>
- Park, J. H., Ju, Y. H., Choi, J. W., Song, H. J., Jang, B. K., Woo, J., Chun, H., Kim, H. J., Shin, S. J., Yarishkin, O., Jo, S., Park, M., Yeon, S. K., Kim, S., Kim, J., Nam, M. H., Londhe, A. M., Kim, J., Cho, S. J., ... Park, K. D. (2019). Newly developed reversible MAO-B inhibitor circumvents the shortcomings of irreversible inhibitors in Alzheimer's disease. *Science Advances*, 5(3), 1–13.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aav0316>
- Pekny, M., Wilhelmsson, U., Tatlisumak, T., & Pekna, M. (2019). Astrocyte activation and reactive gliosis—A new target in stroke? *Neuroscience Letters*, 689, 45–55.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.07.021>
- Perez-Nievas, B. G., & Serrano-Pozo, A. (2018). Deciphering the astrocyte reaction in

- Alzheimer's disease. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 10, Issue APR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00114>
- Perry, G., Friedman, R., Hui Kang, D., Manetto, V., Autilio-Gambetti, L., & Gambetti, P. (1987). Antibodies to the neuronal cytoskeleton are elicited by Alzheimer paired helical filament fractions. *Brain Research*, 420(2), 233–242. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)91243-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)91243-1)
- Pfaff, D., Fiedler, U., & Augustin, H. G. (2006). Emerging roles of the Angiopoietin-Tie and the ephrin-Eph systems as regulators of cell trafficking. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(4), 719–726. <https://doi.org/10.1189/jlb.1105652>
- Pfriege, F. W. (2010). Role of glial cells in the formation and maintenance of synapses. In *Brain Research Reviews* (Vol. 63, Issues 1–2, pp. 39–46). <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.11.002>
- Pierzynowska, K., Gaffke, L., Cyske, Z., Puchalski, M., Rintz, E., Bartkowski, M., Osiadły, M., Pierzynowski, M., Mantej, J., Piotrowska, E., & Węgrzyn, G. (2018). Autophagy stimulation as a promising approach in treatment of neurodegenerative diseases. In *Metabolic Brain Disease* (Vol. 33, Issue 4, pp. 989–1008). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0214-6>
- Pini, L., Pievani, M., Bocchetta, M., Altomare, D., Bosco, P., Cavedo, E., Galluzzi, S., Marizzoni, M., & Frisoni, G. B. (2016). Brain atrophy in Alzheimer's Disease and aging. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 30, pp. 25–48). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.01.002>
- Pleiss, M. M., Sompol, P., Kraner, S. D., Abdul, H. M., Furman, J. L., Guttmann, R. P., Wilcock, D. M., Nelson, P. T., & Norris, C. M. (2016). Calcineurin proteolysis in astrocytes: Implications for impaired synaptic function. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1862(9), 1521–1532. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.05.007>
- Plog, B. A., & Nedergaard, M. (2018). The Glymphatic System in Central Nervous System Health and Disease: Past, Present, and Future. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 13(1), 379–394. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-051217-111018>
- Pomilio, C., Pavia, P., Gorjod, R. M., Vinuesa, A., Alaimo, A., Galvan, V., Kotler, M. L., Beauquis, J., & Saravia, F. (2016). Glial alterations from early to late stages in a model of Alzheimer's disease: Evidence of autophagy involvement in A β internalization. *Hippocampus*, 26(2), 194–210. <https://doi.org/10.1002/hipo.22503>
- Pottier, C., Ravenscroft, T. A., Brown, P. H., Finch, N. C. A., Baker, M., Parsons, M., Asmann, Y. W., Ren, Y., Christopher, E., Levitch, D., van Blitterswijk, M., Cruchaga, C., Campion, D., Nicolas, G., Richard, A. C., Guerreiro, R., Bras, J. T., Zuchner, S., Gonzalez, M. A., ... Rademakers, R. (2016). TYROBP genetic variants in early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 48, 222.e9–222.e15. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.07.028>
- Priego, N., Zhu, L., Monteiro, C., Mulders, M., Wasilewski, D., Bindeman, W., Doglio, L., Martínez, L., Martínez-Saez, E., Cajal, S. R. Y., Megías, D., Hernández-Encinas, E., Blanco-Aparicio, C., Martínez, L., Zarzuela, E., Muñoz, J., Fustero-Torre, C., Piñeiro-Yáñez, E., Hernández-Laín, A., ... Valiente, M. (2018). STAT3 labels a subpopulation of reactive astrocytes required for brain metastasis article. *Nature Medicine*, 24(7), 1024–1035. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0044-4>
- Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's disease. In *New England*

- Journal of Medicine* (Vol. 362, Issue 4, pp. 329–344). Massachusetts Medical Society. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0909142>
- RA, N., J, W., A, K., WH, Y., C, P., A, C., & AM, C. (2005). Extensive Involvement of Autophagy in Alzheimer Disease: An Immuno-Electron Microscopy Study. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 64(2). <https://doi.org/10.1093/JNEN/64.2.113>
- Ransohoff, R. M. (2016). A polarizing question: Do M1 and M2 microglia exist. In *Nature Neuroscience* (Vol. 19, Issue 8, pp. 987–991). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nn.4338>
- Regan, M. R., Huang, Y. H., Yu, S. K., Dykes-Hoberg, M. I., Jin, L., Watkins, A. M., Bergles, D. E., & Rothstein, J. D. (2007). Variations in promoter activity reveal a differential expression and physiology of glutamate transporters by glia in the developing and mature CNS. *Journal of Neuroscience*, 27(25), 6607–6619. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0790-07.2007>
- Reichard, A., & Asosingh, K. (2019). Best Practices for Preparing a Single Cell Suspension from Solid Tissues for Flow Cytometry. *Cytometry Part A*, 95(2), 219–226. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23690>
- Reichenbach, N., Delekate, A., Breithausen, B., Keppler, K., Poll, S., Schulte, T., Peter, J., Plescher, M., Hansen, J. N., Blank, N., Keller, A., Fuhrmann, M., Henneberger, C., Halle, A., & Petzold, G. C. (2018). P2Y1 receptor blockade normalizes network dysfunction and cognition in an Alzheimer's disease model. *Journal of Experimental Medicine*, 215(6), 1649–1663. <https://doi.org/10.1084/jem.20171487>
- Reichenbach, N., Delekate, A., Plescher, M., Schmitt, F., Krauss, S., Blank, N., Halle, A., & Petzold, G. C. (2019). Inhibition of Stat3-mediated astrogliosis ameliorates pathology in an Alzheimer's disease model. *EMBO Molecular Medicine*, 11(2). <https://doi.org/10.15252/emmm.201809665>
- Reisin, H. D., & Colombo, J. A. (2002). Astroglial interlaminar processes in human cerebral cortex: Variations in cytoskeletal profiles. *Brain Research*, 937(1–2), 51–57. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)02464-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)02464-2)
- Rodríguez-Arellano, J. J., Parpura, V., Zorec, R., & Verkhratsky, A. (2016). Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. In *Neuroscience* (Vol. 323, pp. 170–182). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.01.007>
- Rodríguez, J. J., Olabarria, M., Chvatal, A., & Verkhratsky, A. (2009). Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 16, Issue 3, pp. 378–385). Cell Death Differ. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.172>
- Rose, C. R., & Karus, C. (2013). Two sides of the same coin: Sodium homeostasis and signaling in astrocytes under physiological and pathophysiological conditions. In *GLIA* (Vol. 61, Issue 8, pp. 1191–1205). <https://doi.org/10.1002/glia.22492>
- Rosenberg, R. N., Lambracht-Washington, D., Yu, G., & Xia, W. (2016). Genomics of Alzheimer disease: A review. In *JAMA Neurology* (Vol. 73, Issue 7, pp. 867–874). American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.0301>
- Rossi, D., Brambilla, L., Valori, C. F., Crugnola, A., Giaccone, G., Capobianco, R., Mangieri, M., Kingston, A. E., Bloc, A., Bezzi, P., & Volterra, A. (2005). Defective tumor necrosis factor- α -dependent control of astrocyte glutamate release in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*, 280(51), 42088–42096. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504124200>
- Rothhammer, V., Borucki, D. M., Tjon, E. C., Takenaka, M. C., Chao, C. C., Ardura-Fabregat, A., De Lima, K. A., Gutiérrez-Vázquez, C., Hewson, P., Staszewski, O.,

- Blain, M., Healy, L., Neziraj, T., Borio, M., Wheeler, M., Dragin, L. L., Laplaud, D. A., Antel, J., Alvarez, J. I., ... Quintana, F. J. (2018). Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature*, 557(7707), 724–728. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0119-x>
- Rouach, N., Avignone, E., Mème, W., Koulakoff, A., Venance, L., Blomstrand, F., & Giaume, C. (2002). Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. In *Biology of the Cell* (Vol. 94, Issues 7–8, pp. 457–475). [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(02\)00016-3](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(02)00016-3)
- Roux, L., Benchenane, K., Rothstein, J. D., Bonvento, G., & Giaume, C. (2011). Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(45), 18442–18446. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107386108>
- Safieh, M., Korczyn, A. D., & Michaelson, D. M. (2019). ApoE4: an emerging therapeutic target for Alzheimer's disease. *BMC Medicine*, 17(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12916-019-1299-4>
- Saggu, R., Schumacher, T., Gerich, F., Rakers, C., Tai, K., Delekate, A., & Petzold, G. C. (2016). Astroglial NF-κB contributes to white matter damage and cognitive impairment in a mouse model of vascular dementia. *Acta Neuropathologica Communications*, 4(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0350-3>
- Saint-Aubert, L., Lemoine, L., Chiotis, K., Leuzy, A., Rodriguez-Vieitez, E., & Nordberg, A. (2017). Tau PET imaging: present and future directions. In *Molecular Neurodegeneration* (Vol. 12, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0162-3>
- Sala Frigerio, C., Wolfs, L., Fattorelli, N., Thrupp, N., Voytyuk, I., Schmidt, I., Mancuso, R., Chen, W. T., Woodbury, M. E., Srivastava, G., Möller, T., Hudry, E., Das, S., Saido, T., Karran, E., Hyman, B., Perry, V. H., Fiers, M., & De Strooper, B. (2019). The Major Risk Factors for Alzheimer's Disease: Age, Sex, and Genes Modulate the Microglia Response to Aβ Plaques. *Cell Reports*, 27(4), 1293–1306.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.099>
- Sarlus, H., & Heneka, M. T. (2017). Microglia in Alzheimer's disease. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 127, Issue 9, pp. 3240–3249). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI90606>
- Savtchouk, I., & Volterra, A. (2018). Gliotransmission: Beyond black-and-white. *Journal of Neuroscience*, 38(1), 14–25. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0017-17.2017>
- Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M. M. B., de Strooper, B., Frisoni, G. B., Salloway, S., & Van der Flier, W. M. (2016). Alzheimer's disease. In *The Lancet* (Vol. 388, Issue 10043, pp. 505–517). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01124-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01124-1)
- Scimemi, A., Meabon, J. S., Woltjer, R. L., Sullivan, J. M., Diamond, J. S., & Cook, D. G. (2013). Amyloid-β1-42 slows clearance of synaptically released glutamate by mislocalizing astrocytic GLT-1. *Annals of Internal Medicine*, 158(6), 5312–5318. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5274-12.2013>
- Sekar, S., McDonald, J., Cuyugan, L., Aldrich, J., Kurdoglu, A., Adkins, J., Serrano, G., Beach, T. G., Craig, D. W., Valla, J., Reiman, E. M., & Liang, W. S. (2015). Alzheimer's disease is associated with altered expression of genes involved in immune response and mitochondrial processes in astrocytes. *Neurobiology of Aging*, 36(2), 583–591. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.027>
- Sengupta, U., Nilson, A. N., & Kaye, R. (2016). The Role of Amyloid-β Oligomers in

- Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. In *EBioMedicine* (Vol. 6, pp. 42–49). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.03.035>
- Serrano-Pérez, M. C., Martín, E. D., Vaquero, C. F., Azcoitia, I., Calvo, S., Cano, E., & Tranque, P. (2011). Response of transcription factor NFATc3 to excitotoxic and traumatic brain insults: Identification of a subpopulation of reactive astrocytes. *GLIA*, 59(1), 94–107. <https://doi.org/10.1002/glia.21079>
- Serrano-Pozo, A., Gómez-Isla, T., Growdon, J. H., Frosch, M. P., & Hyman, B. T. (2013). A phenotypic change but not proliferation underlies glial responses in Alzheimer disease. *American Journal of Pathology*, 182(6), 2332–2344. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.02.031>
- Shafiei, S. S., Guerrero-Muñoz, M. J., & Castillo-Carranza, D. L. (2017). Tau oligomers: Cytotoxicity, propagation, and mitochondrial damage. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 9, Issue APR). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00083>
- Shilova, O. N., Shilov, E. S., & Deyev, S. M. (2017). The effect of trypan blue treatment on autofluorescence of fixed cells. In *Cytometry Part A* (Vol. 91, Issue 9, pp. 917–925). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23199>
- Shiow, L. R., Favrais, G., Schirmer, L., Schang, A. L., Cipriani, S., Andres, C., Wright, J. N., Nobuta, H., Fleiss, B., Gressens, P., & Rowitch, D. H. (2017). Reactive astrocyte COX2-PGE2 production inhibits oligodendrocyte maturation in neonatal white matter injury. *GLIA*, 65(12), 2024–2037. <https://doi.org/10.1002/glia.23212>
- Simpson, J. E., Ince, P. G., Lace, G., Forster, G., Shaw, P. J., Matthews, F., Savva, G., Brayne, C., & Wharton, S. B. (2010). Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiology of Aging*, 31(4), 578–590. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.05.015>
- Sirko, S., Behrendt, G., Johansson, P. A., Tripathi, P., Costa, M., Bek, S., Heinrich, C., Tiedt, S., Colak, D., Dichgans, M., Fischer, I. R., Plesnila, N., Staufenbiel, M., Haass, C., Snapyan, M., Saghatelian, A., Tsai, L. H., Fischer, A., Grobe, K., ... Götz, M. (2013). Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog glia. *Cell Stem Cell*, 12(4), 426–439. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.01.019>
- Sirko, S., Irmeler, M., Gascón, S., Bek, S., Schneider, S., Dimou, L., Obermann, J., De Souza Paiva, D., Poirier, F., Beckers, J., Hauck, S. M., Barde, Y. A., & Götz, M. (2015). Astrocyte reactivity after brain injury—: The role of galectins 1 and 3. *GLIA*, 63(12), 2340–2361. <https://doi.org/10.1002/glia.22898>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 119, Issue 1, pp. 7–35). <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Sofroniew, M. V. (2018). Dissecting spinal cord regeneration. *Nature*, 557(7705), 343–350. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0068-4>
- Sompol, P., Furman, J. L., Pleiss, M. M., Kraner, S. D., Artiushin, I. A., Batten, S. R., Quintero, J. E., Simmerman, L. A., Beckett, T. L., Lovell, M. A., Murphy, M. P., Gerhardt, G. A., & Norris, C. M. (2017). Calcineurin/NFAT signaling in activated astrocytes drives network hyperexcitability in Aβ-bearing mice. *Journal of Neuroscience*, 37(25), 6132–6148. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0877-17.2017>
- Sompol, P., & Norris, C. M. (2018). Ca²⁺, Astrocyte Activation and Calcineurin/NFAT Signaling in Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Aging*

- Neuroscience*, 10(JUL), 199. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00199>
- Sotelo, C. (2003). Viewing the brain through the master hand of Ramon y Cajal. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(1), 71–77. <https://doi.org/10.1038/nrn1010>
- Spires-Jones, T. L., & Hyman, B. T. (2014). The Intersection of Amyloid Beta and Tau at Synapses in Alzheimer's Disease. In *Neuron* (Vol. 82, Issue 4, pp. 756–771). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.004>
- Stelzmann, R. A., Norman Schnitzlein, H., & Reed Murtagh, F. (1995). An english translation of alzheimer's 1907 paper, "über eine eigenartige erkankung der hirnrinde." *Clinical Anatomy*, 8(6), 429–431. <https://doi.org/10.1002/ca.980080612>
- Stephenson, J., Nutma, E., van der Valk, P., & Amor, S. (2018). Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. In *Immunology* (Vol. 154, Issue 2, pp. 204–219). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/imm.12922>
- Stevens, B., Allen, N. J., Vazquez, L. E., Howell, G. R., Christopherson, K. S., Nouri, N., Micheva, K. D., Mehalow, A. K., Huberman, A. D., Stafford, B., Sher, A., Litke, A. M. M., Lambris, J. D., Smith, S. J., John, S. W. M., & Barres, B. A. (2007). The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell*, 131(6), 1164–1178. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.036>
- Stogsdill, J. A., Ramirez, J., Liu, D., Kim, Y. H., Baldwin, K. T., Enustun, E., Ejikeme, T., Ji, R. R., & Eroglu, C. (2017). Astrocytic neuroligins control astrocyte morphogenesis and synaptogenesis. *Nature*, 551(7679), 192–197. <https://doi.org/10.1038/nature24638>
- Sun, D., Qu, J., & Jakobs, T. C. (2013). Reversible reactivity by optic nerve astrocytes. *GLIA*, 61(8), 1218–1235. <https://doi.org/10.1002/glia.22507>
- Sun, S., Sun, Y., Ling, S. C., Ferraiuolo, L., McAlonis-Downes, M., Zou, Y., Drenner, K., Wang, Y., Ditsworth, D., Tokunaga, S., Kopelevich, A., Kaspar, B. K., Lagier-Tourenne, C., & Cleveland, D. W. (2015). Translational profiling identifies a cascade of damage initiated in motor neurons and spreading to glia in mutant sod1-mediated ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(50), E6993–E7002. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520639112>
- Takano, T., Han, X., Deane, R., Zlokovic, B., & Nedergaard, M. (2007). Two-photon imaging of astrocytic Ca²⁺ signaling and the microvasculature in experimental mice models of Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1097, 40–50. <https://doi.org/10.1196/annals.1379.004>
- Takata, N., & Hirase, H. (2008). Cortical layer 1 and layer 2/3 astrocytes exhibit distinct calcium dynamics in vivo. *PLoS ONE*, 3(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002525>
- Talantova, M., Sanz-Blasco, S., Zhang, X., Xia, P., Akhtar, M. W., Okamoto, S. I., Dziewczapolski, G., Nakamura, T., Cao, G., Pratt, A. E., Kang, Y. J., Tu, S., Molokanova, E., McKercher, S. R., Hires, S. A., Sason, H., Stouffer, D. G., Buczynski, M. W., Solomon, J. P., ... Lipton, S. A. (2013). Aβ induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(27). <https://doi.org/10.1073/pnas.1306832110>
- Tarassishin, L., Suh, H. S., & Lee, S. C. (2014). LPS and IL-1 differentially activate mouse and human astrocytes: Role of CD14. *GLIA*, 62(6), 999–1013. <https://doi.org/10.1002/glia.22657>
- Thal, D. R., Rüb, U., Orantes, M., & Braak, H. (2002). Phases of Aβ-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, 58(12), 1791–

1800. <https://doi.org/10.1212/WNL.58.12.1791>
- Theparambil, S. M., & Deitmer, J. W. (2015). High effective cytosolic H⁺ buffering in mouse cortical astrocytes attributable to fast bicarbonate transport. *GLIA*, 63(9), 1581–1594. <https://doi.org/10.1002/glia.22829>
- Tortarolo, M., Veglianesi, P., Calvaresi, N., Botturi, A., Rossi, C., Giorgini, A., Migheli, A., & Bendotti, C. (2003). Persistent activation of p38 mitogen-activated protein kinase in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis correlates with disease progression. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 23(2), 180–192. [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00022-8](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00022-8)
- Tsai, H.-H., Li, H., Fuentealba, L. C., Molofsky, A. V., Taveira-Marques, R., Zhuang, H., Tenney, A., Murnen, A. T., Fancy, S. P. J., Merkle, F., Kessaris, N., Alvarez-Buylla, A., Richardson, W. D., & Rowitch, D. H. (2012). Regional astrocyte allocation regulates CNS synaptogenesis and repair. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6092), 358–362. <https://doi.org/10.1126/science.1222381>
- Turovsky, E., Theparambil, S. M., Kasymov, V., Deitmer, J. W., Del Arroyo, A. G., Ackland, G. L., Corneveaux, J. J., Allen, A. N., Huentelman, M. J., Kasparov, S., Marina, N., & Gourine, A. V. (2016). Mechanisms of CO₂/H⁺ sensitivity of astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 36(42), 10750–10758. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1281-16.2016>
- Tydlacka, S., Wang, C. E., Wang, X., Li, S., & Li, X. J. (2008). Differential activities of the ubiquitin-proteasome system in neurons versus glia may account for the preferential accumulation of misfolded proteins in neurons. *Journal of Neuroscience*, 28(49), 13285–13295. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4393-08.2008>
- Tyzack, G. E., Hall, C. E., Sibley, C. R., Cymes, T., Forostyak, S., Carlino, G., Meyer, I. F., Schiavo, G., Zhang, S. C., Gibbons, G. M., Newcombe, J., Patani, R., & Lakatos, A. (2017). A neuroprotective astrocyte state is induced by neuronal signal EphB1 but fails in ALS models. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01283-z>
- Tyzack, G. E., Sitnikov, S., Barson, D., Adams-Carr, K. L., Lau, N. K., Kwok, J. C., Zhao, C., Franklin, R. J. M., Karadottir, R. T., Fawcett, J. W., & Lakatos, A. (2014). Astrocyte response to motor neuron injury promotes structural synaptic plasticity via STAT3-regulated TSP-1 expression. *Nature Communications*, 5, 4294. <https://doi.org/10.1038/ncomms5294>
- Tyzack, G., Lakatos, A., & Patani, R. (2016). Human Stem Cell-Derived Astrocytes: Specification and Relevance for Neurological Disorders. *Current Stem Cell Reports*, 2(3), 236–247. <https://doi.org/10.1007/s40778-016-0049-1>
- Ullah, M. F., Ahmad, A., Bhat, S. H., Abu-Duhier, F. M., Barreto, G. E., & Ashraf, G. M. (2019). Impact of sex differences and gender specificity on behavioral characteristics and pathophysiology of neurodegenerative disorders. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 102, pp. 95–105). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.04.003>
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, ilip, Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, rank. (2002). *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. <http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034.1>Correspondence:rankSpeleman.
- Varnum, M. M., & Ikezu, T. (2012). The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in alzheimer's disease brain. In

- Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (Vol. 60, Issue 4, pp. 251–266). Arch Immunol Ther Exp (Warsz). <https://doi.org/10.1007/s00005-012-0181-2>
- Végh, M. J., Heldring, C. M., Kamphuis, W., Hijazi, S., Timmerman, A. J., Li, K. W., van Nierop, P., Mansvelder, H. D., Hol, E. M., Smit, A. B., & van Kesteren, R. E. (2014). Reducing hippocampal extracellular matrix reverses early memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0076-z>
- Velasco-Estevez, M., Mampay, M., Boutin, H., Chaney, A., Warn, P., Sharp, A., Burgess, E., Moeendarbary, E., Dev, K. K., & Sheridan, G. K. (2018). Infection augments expression of mechanosensing Piezo1 channels in amyloid plaque-reactive astrocytes. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10(OCT). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00332>
- Verkhratsky, A., & Nedergaard, M. (2018). PHYSIOLOGY OF ASTROGLIA. *Physiology of Astroglia. Physiol Rev*, 98, 239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016.-Astro>
- Verkhratsky, Alexei. (2019). Astroglial calcium signaling in aging and alzheimer's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035188>
- Verkhratsky, Alexei, & Nedergaard, M. (2018). Physiology of astroglia. *Physiological Reviews*, 98(1), 239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>
- Verkhratsky, Alexei, Trebak, M., Perocchi, F., Khananshvil, D., & Sekler, I. (2018). Crosslink between calcium and sodium signalling. In *Experimental Physiology* (Vol. 103, Issue 2, pp. 157–169). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1113/EP086534>
- Verkhratsky, Alexei, Zorec, R., Rodríguez, J. J., & Parpura, V. (2016). Astroglia dynamics in ageing and Alzheimer's disease. In *Current Opinion in Pharmacology* (Vol. 26, pp. 74–79). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.09.011>
- Verret, L., Jankowsky, J. L., Xu, G. M., Borchelt, D. R., & Rampon, C. (2007). Alzheimer's-type amyloidosis in transgenic mice impairs survival of newborn neurons derived from adult hippocampal neurogenesis. *Journal of Neuroscience*, 27(25), 6771–6780. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5564-06.2007>
- Volianskis, A., Køstner, R., Mølgaard, M., Hass, S., & Jensen, M. S. (2010). Episodic memory deficits are not related to altered glutamatergic synaptic transmission and plasticity in the CA1 hippocampus of the APPswe/PS1ΔE9-deleted transgenic mice model of β-amyloidosis. *Neurobiology of Aging*, 31(7), 1173–1187. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.08.005>
- von Bartheld, C. S., Bahney, J., & Herculano-Houzel, S. (2016). The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. In *Journal of Comparative Neurology* (Vol. 524, Issue 18, pp. 3865–3895). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/cne.24040>
- Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2006). Morris water maze: Procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols*, 1(2), 848–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>
- Wang, H., Yuan, G., Prabhakar, N. R., Boswell, M., & Katz, D. M. (2006). Secretion of brain-derived neurotrophic factor from PC12 cells in response to oxidative stress requires autocrine dopamine signaling. *Journal of Neurochemistry*, 96(3), 694–705. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03572.x>
- Wang, S., & Colonna, M. (2019). Microglia in Alzheimer's disease: A target for

- immunotherapy. In *Journal of Leukocyte Biology* (Vol. 106, Issue 1, pp. 219–227). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0818-319R>
- Wang, Yan, & Le, W. D. (2019). Autophagy and Ubiquitin-Proteasome System. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1206, pp. 527–550). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_25
- Wang, Yipeng, & Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 17, Issue 1, pp. 5–21). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.1>
- Wanner, I. B., Anderson, M. A., Song, B., Levine, J., Fernandez, A., Gray-Thompson, Z., Ao, Y., & Sofroniew, M. V. (2013a). Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 33(31), 12870–12886. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2121-13.2013>
- Webster, S. J., Bachstetter, A. D., Nelson, P. T., Schmitt, F. A., & Van Eldik, L. J. (2014). Using mice to model Alzheimer's dementia: An overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Frontiers in Genetics*, 5(APR). <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00088>
- Weller, J., & Budson, A. (2018). Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. In *F1000Research* (Vol. 7). F1000 Research Ltd. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14506.1>
- Wheeler, M. A., Clark, I. C., Tjon, E. C., Li, Z., Zandee, S. E. J., Couturier, C. P., Watson, B. R., Scalisi, G., Alkwai, S., Rothhammer, V., Rotem, A., Heyman, J. A., Thaploo, S., Sanmarco, L. M., Ragoussis, J., Weitz, D. A., Petrecca, K., Moffitt, J. R., Becher, B., ... Quintana, F. J. (2020). MAFG-driven astrocytes promote CNS inflammation. *Nature*, 578(7796), 593–599. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1999-0>
- Wheeler, M. A., Jaronen, M., Covacu, R., Zandee, S. E. J., Scalisi, G., Rothhammer, V., Tjon, E. C., Chao, C. C., Kenison, J. E., Blain, M., Rao, V. T. S., Hewson, P., Barroso, A., Gutiérrez-Vázquez, C., Prat, A., Antel, J. P., Hauser, R., & Quintana, F. J. (2019a). Environmental Control of Astrocyte Pathogenic Activities in CNS Inflammation. *Cell*, 176(3), 581–596.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.012>
- Wheeler, M. A., & Quintana, F. J. (2019b). Regulation of Astrocyte Functions in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029009>
- Wilhelmsson, U., Bushong, E. A., Price, D. L., Smarr, B. L., Phung, V., Terada, M., Ellisman, M. H., & Pekny, M. (2006b). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46), 17513–17518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602841103>
- Withana, N. P., Garland, M., Verdoes, M., Ofori, L. O., Segal, E., & Bogyo, M. (2016). Labeling of active proteases in fresh-frozen tissues by topical application of quenched activity-based probes. *Nature Protocols*, 11(1), 184–191. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.004>
- Wu, Z., Guo, Z., Gearing, M., & Chen, G. (2014). Tonic inhibition in dentate gyrus impairs long-term potentiation and memory in an Alzheimer's disease model. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms5159>
- Wyss-Coray, T., Loike, J. D., Brionne, T. C., Lu, E., Anankov, R., Yan, F., Silverstein,

- S. C., & Husemann, J. (2003). Adult mouse astrocytes degrade amyloid- β in vitro and in situ. *Nature Medicine*, 9(4), 453–457. <https://doi.org/10.1038/nm838>
- Xia, M. Q., Bacsikai, B. J., Knowles, R. B., Qin, S. X., & Hyman, B. T. (2000). Expression of the chemokine receptor CXCR3 on neurons and the elevated expression of its ligand IP-10 in reactive astrocytes: In vitro ERK1/2 activation and role in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroimmunology*, 108(1–2), 227–235. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(00\)00285-X](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(00)00285-X)
- Xiao, Q., Yan, P., Ma, X., Liu, H., Perez, R., Zhu, A., Gonzales, E., Burchett, J. M., Schuler, D. R., Cirrito, J. R., Diwan, A., & Lee, J. M. (2014). Enhancing astrocytic lysosome biogenesis facilitates A β clearance and attenuates amyloid plaque pathogenesis. *Journal of Neuroscience*, 34(29), 9607–9620. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3788-13.2014>
- Yan, R., Fan, Q., Zhou, J., & Vassar, R. (2016). Inhibiting BACE1 to reverse synaptic dysfunctions in Alzheimer's disease. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 65, pp. 326–340). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.03.025>
- Yang, Q. qiao, & Zhou, J. wei. (2019). Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells. In *GLIA* (Vol. 67, Issue 6, pp. 1017–1035). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/glia.23571>
- Yang, Y. M., Shang, D. S., Zhao, W. D., Fang, W. G., & Chen, Y. H. (2013). Microglial TNF- α -dependent elevation of MHC class i expression on brain endothelium induced by amyloid-beta promotes T cell transendothelial migration. *Neurochemical Research*, 38(11), 2295–2304. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1138-5>
- Yi, C., Koulakoff, A., & Giaume, C. (2017). Astroglial Connexins as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Current Pharmaceutical Design*, 23(33). <https://doi.org/10.2174/1381612823666171004151215>
- Yin, K. J., Cirrito, J. R., Yan, P., Hu, X., Xiao, Q., Pan, X., Bateman, R., Song, H., Hsu, F. F., Turk, J., Xu, J., Hsu, C. Y., Mills, J. C., Holtzman, D. M., & Lee, J. M. (2006). Matrix metalloproteinases expressed by astrocytes mediate extracellular amyloid- β peptide catabolism. *Journal of Neuroscience*, 26(43), 10939–10948. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2085-06.2006>
- Yoshimura, A., Mori, H., Ohishi, M., Aki, D., & Hanada, T. (2003). Negative regulation of cytokine signaling influences inflammation. In *Current Opinion in Immunology* (Vol. 15, Issue 6, pp. 704–708). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.09.004>
- Yun, S. P., Kam, T.-I., Panicker, N., Kim, S., Oh, Y., Park, J.-S., Kwon, S.-H., Park, Y. J., Karuppagounder, S. S., Park, H., Kim, S., Oh, N., Kim, N. A., Lee, S., Brahmachari, S., Mao, X., Lee, J. H., Kumar, M., An, D., ... Ko, H. S. (2018). Block of A1 astrocyte conversion by microglia is neuroprotective in models of Parkinson's disease. *Nature Medicine*, 24(7), 931–938. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0051-5>
- Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R. G., & Barres, B. A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *Journal of Neuroscience*, 32(18), 6391–6410. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012>
- Zeisel, A., Hochgerner, H., Lönnerberg, P., Johnsson, A., Memic, F., van der Zwan, J., Häring, M., Braun, E., Borm, L. E., La Manno, G., Codeluppi, S., Furlan, A., Lee, K., Skene, N., Harris, K. D., Hjerling-Leffler, J., Arenas, E., Ernfors, P., Marklund, U., & Linnarsson, S. (2018). Molecular Architecture of the Mouse Nervous System.

- Cell*, 174(4), 999–1014.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.021>
- Zhang, Q., Lenardo, M. J., & Baltimore, D. (2017). 30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell*, 168(1–2), 37–57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.012>
- Zhang, Y., & Barres, B. A. (2010). Astrocyte heterogeneity: An underappreciated topic in neurobiology. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 20, Issue 5, pp. 588–594). <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.06.005>
- Zhao, Jie, O'Connor, T., & Vassar, R. (2011). The contribution of activated astrocytes to A β production: Implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *Journal of Neuroinflammation*, 8. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-150>
- Zhao, Jing, Davis, M. D., Martens, Y. A., Shinohara, M., Graff-Radford, N. R., Younkin, S. G., Wszolek, Z. K., Kanekiyo, T., & Bu, G. (2017). APOE ϵ 4/ ϵ 4 diminishes neurotrophic function of human iPSC-derived astrocytes. *Human Molecular Genetics*, 26(14), 2690–2700. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx155>
- Zipfel, P. F., & Skerka, C. (2009). Complement regulators and inhibitory proteins. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 9, Issue 10, pp. 729–740). Nat Rev Immunol. <https://doi.org/10.1038/nri2620>
- Zorec, R., Parpura, V., Vardjan, N., & Verkhratsky, A. (2017). Astrocytic face of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 322(Pt B), 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.05.021>
- Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., & Trono, D. (1998). Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., & Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *Journal of Virology*, 72(12), 9873–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9811723> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC110499>

Titre : Hétérogénéité de la réactivité astrocytaire dans la maladie d'Alzheimer

Mots clés : Astrocytes réactifs – Maladies neurodégénératives – Hétérogénéité – Transcriptomique – Signalisation – Systèmes rapporteurs

Résumé : Les astrocytes sont essentiels au fonctionnement du cerveau. Dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (MA), les astrocytes deviennent réactifs. Le rôle des astrocytes réactifs (AR) dans la MA reste débattu.

Nous avons utilisé une approche virale permettant de moduler sélectivement les AR, *in vivo*, par ciblage de la voie JAK2-STAT3 dans deux modèles murins de la MA. Nous observons que l'inhibition des AR améliore la pathologie amyloïde et l'apprentissage spatial chez les souris APP/PS1dE9 (Ceyzériat et al., 2018). Dans les souris 3xTg-AD, la modulation des AR améliore la transmission et la plasticité synaptique mais n'a pas d'effet sur les pathologies amyloïde et Tau ou la mémoire spatiale (Guillemaud et al., 2019).

Ces résultats suggèrent que les AR ont des effets

variables et adoptent des changements moléculaires et fonctionnels spécifiques, selon le contexte pathologique (Escartin et al., 2019).

Les cascades de signalisation qui contrôlent une telle diversité ne sont à ce jour, pas identifiées. Notre étude a pour but d'étudier le profil transcriptionnel et fonctionnel de différentes classes d'astrocytes réactifs identifiées par les cascades de signalisation activées, dans le cortex préfrontal de souris APP/PS1dE9.

Nous observons que les cascades STAT3 et NF- κ B sont activées de manière hétérogène dans les AR et définissent des classes d'AR moléculairement et fonctionnellement distinctes.

Ce travail démontre la complexité des AR dans la MA et a permis de valider de nouveaux outils pour l'étude l'hétérogénéité des AR.

Title : Heterogeneity of reactive astrocytes in Alzheimer's disease

Keywords : Reactive astrocytes – Neurodegenerative diseases – Heterogeneity – Transcriptomics – Signaling – Reporter systems

Abstract : Astrocytes are essential for brain function. In Alzheimer's disease (AD), astrocytes become reactive. The role of reactive astrocyte (RA) in AD is still debated. We used a viral approach to selectively modulate RA *in vivo*, by targeting the JAK2-STAT3 pathway in two AD mouse models. We report deleterious effects of RA on amyloid pathology and spatial learning in APP/PS1dE9 mice (Ceyzériat et al., 2018). In 3xTg-AD mice, the modulation of RA improves synaptic transmission and plasticity but has no effect on amyloid and Tau pathologies or spatial memory (Guillemaud et al., 2019). These results suggest that RA have variable effects in disease and acquire context-dependent molecular

and functional changes (Escartin et al., 2019).

The signaling cascades controlling RA diversity have not yet been identified. Our goal was to study the transcriptional profile and functional features of different classes of reactive astrocytes identified by their signaling cascades, in the prefrontal cortex of APP/PS1dE9 mice.

We found that the STAT3 and NF- κ B pathways are activated heterogeneously and defines molecularly and functionally different classes of RA.

Overall, this project demonstrates the complexity of RA in AD and validates new tools to studying RA heterogeneity.