



HAL
open science

Rôle du récepteur 5-HT2B dans la motilité des cellules microgliales

Fanny Etienne

► **To cite this version:**

Fanny Etienne. Rôle du récepteur 5-HT2B dans la motilité des cellules microgliales. Sciences du Vivant [q-bio]. Sorbonne université, 2020. Français. NNT : . tel-04032726v1

HAL Id: tel-04032726

<https://inserm.hal.science/tel-04032726v1>

Submitted on 13 Mar 2023 (v1), last revised 16 Mar 2023 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Sorbonne Université

École doctorale 394, Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

Institut du Fer à Moulin / Équipe « Sérotonine, microglie et plasticité »

Thèse de doctorat de Neurosciences

Rôle du récepteur 5-HT_{2B} dans la motilité des cellules microgliales

Par Fanny ETIENNE

Dirigée par Anne Roumier et Luc Maroteaux

Présentée et soutenue publiquement le 26 Mars 2020

Devant un jury composé de :

Mme. Isabelle DUSART	Directrice de Recherche	Présidente du Jury
Mme. Lauriane ULMANN	Maître de Conférence	Rapportrice
M. Alain BESSIS	Directeur de Recherche	Rapporteur
M. Nicolas GERVASI	Chargé de Recherche	Examineur
M. Luc MAROTEAUX	Directeur de Recherche	Co-Directeur de thèse
Mme. Anne ROUMIER	Maître de Conférence	Directrice de thèse



*La différence entre le possible et l'impossible
se trouve dans la détermination*

Mahatma Gandhi

*Je dédie cette thèse à Stéphane,
Mon Parrain*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier, avant toute chose, les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer ces quatre années de travail. Je remercie ainsi Isabelle Dusart d'avoir accepté de présider mon jury lors de la soutenance, Lauriane Ulmann et Alain Bessis d'avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteur de ma thèse et enfin Nicolas Gervasi d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je remercie également Luc Maroteaux de m'avoir accueilli au sein de son équipe et d'avoir co-dirigé ma thèse en m'apportant toute son expertise et son aide dans le domaine de la sérotonine ainsi que les longues discussions de pharmacologie qui m'ont permis de mieux appréhender certains résultats de ma thèse.

Je remercie très chaleureusement ma directrice de thèse, Anne Roumier, de m'avoir encadrée durant ces quatre années passées au laboratoire. Je te remercie pour tout ce que tu as pu m'apporter au cours de ces années, tant sur le plan scientifique qu'humainement. Tu m'as transmis ton savoir et ton expérience mais tu m'as également aidée à prendre confiance en moi. Je te remercie pour ta patience, ta gentillesse, ton soutien, tes encouragements et ta disponibilité, malgré ton emploi du temps chargé tu as toujours été présente lorsque j'en avais besoin. Je te remercie de m'avoir fait gagner en maturité du point de vue scientifique. Je garderai de très bons souvenirs des moments passés au laboratoire mais également à l'extérieur comme mon premier congrès à Heidelberg (immortalisé par de magnifiques photos !), les différents pots et « beer meeting » mais surtout la fameuse soirée Just Dance chez toi !

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe pour leur aide précieuse et tous les bons moments passés ensemble. Un grand merci à Catherine pour ta disponibilité et ton aide tout au long de ma thèse. J'ai réellement apprécié apprendre à tes côtés mais également de pouvoir discuter aussi bien de sciences que de tout et rien. Nos petites blagues et taquineries vont beaucoup me manquer (« qui aime bien châtie bien ») ! Merci également pour ton soutien et ta bonne humeur qui est contagieuse et elle m'a été d'une grande aide lors de l'écriture de la thèse ! Je remercie aussi Giulia pour ton aide précieuse depuis ton arrivée dans l'équipe. Merci d'avoir toujours pris le temps de m'aider et de me conseiller, notamment avant chacune de mes présentations. Grâce à toi, j'ai pu augmenter mon vocabulaire en italien ! Un grand merci également à Amina d'avoir toujours été à l'écoute lorsque j'en avais besoin mais surtout un grand merci d'avoir ri à toutes mes blagues (et les petites bêtises aussi), tu es sans conteste mon meilleur public ! Je te remercie aussi pour les petites attentions de tous les jours et d'avoir été si patiente lors de mes « quart d'heure de folie » au moment de l'écriture. Enfin je remercie Célia pour ta fraîcheur et ton aide lors de l'écriture, Mélanie pour tous ces verres partagés, Imane pour l'aide en biologie moléculaire mais aussi Corentin pour ses nombreux conseils.

Je tiens à remercier tout particulièrement Nicolas Gervasi pour m'avoir fait découvrir la beauté de la microscopie bi-photonique. Un grand merci pour ta patience et ta disponibilité lorsque j'avais des questions ou des problèmes avec le 2-photons (et il y en avait beaucoup !) mais aussi de m'avoir donné confiance en moi. Tu as été d'une aide considérable tout au long

de ma thèse que ce soit dans l'avancée de mon projet, ta présence lors de mes comités de thèse mais aussi dans mes recherches de post-doctorats.

De manière plus générale, je remercie toutes les personnes de l'IFM avec qui j'ai eu la chance de travailler (et collaborer). Je remercie Vincenzo pour ton aide, le partage du 2-photons a été assez cocasse au début mais on s'en est plutôt bien sorti ! On a tous les deux partagé les mêmes galères (entre les problèmes d'ordinateur, d'écran, de laser...) mais toujours dans la bonne humeur. Je suis très contente d'avoir publié mon premier papier avec toi et je te souhaite tout le meilleur pour la suite ! Je souhaite également remercier Aude pour m'avoir appris à faire des injections stéréotaxiques ainsi que ta bonne humeur, ça a été un plaisir de travailler et de discuter avec toi autour d'un café !

Je remercie également les anciens de l'IFM devenus des amis notamment Emily de m'avoir prise sous ton aile quand je suis arrivée dans l'équipe, Jessica d'avoir réussi le pari fou de m'emmener à la salle de sport (« allez on augmente le poids pour les squats ») et Delfina d'avoir pris le relais. Merci également à Sana, Mariano et Jimmy pour leurs précieux conseils et soutien ainsi que les nombreuses bières partagées au Baratin !

Je remercie profondément Célia d'avoir fait partie de cette aventure. Nous nous sommes connues bien avant la thèse, via notre parcours associatif, cependant se retrouver en thèse dans le même institut nous a énormément rapproché et je te remercie d'avoir été présente à mes côtés. On a, en quelque sorte, veillé l'une sur l'autre au cours de la thèse, et plus particulièrement cette dernière année. Merci d'avoir été là pour m'aider à tenir bon, de t'être assurée que je ne sautais aucun repas, de toutes les pauses café lors de l'écriture mais surtout de toutes nos soirées avec les personnes de l'institut ou avec les copains. A charge de revanche, même de loin je serai là pour te soutenir jusqu'à la fin de ta thèse ! Et promis j'arrête le vélo...

Je tiens à remercier du fond du cœur mes amis, les copains, qui, depuis toutes ces années, sont toujours présents, aussi bien dans les bons moments que les moins bons. Merci d'avoir été là pour fêter les bonnes nouvelles, de m'avoir réconfortée lorsque j'en avais besoin mais surtout de m'avoir soutenu dans mes choix. Comme l'un d'entre vous me l'a dit il n'y a pas si longtemps, vous êtes mes piles Duracell, toujours là pour me recharger les batteries ! Pour toutes ces choses je remercie très fort Laura, Jérémy et Gautier d'avoir été là pour prendre un verre (ou plus), partir en vacances, faire des sorties, Matthieu d'avoir toujours été de si bons conseils et à l'écoute et Pierre de m'avoir toujours motivée et dit à quel point que ce que je faisais était important. Je remercie aussi Loïc, Steven, Mathilde, Guenièvre, Aurélien, Cédric, Jules, Henri, Kelly, Aude, Niko, Romane, Scott et John et les autres, vous êtes géniaux.

Pour finir, je tiens à remercier ma famille pour leur soutien indéfectible au cours de cette thèse. Je remercie ma sœur Julie et mon beau-frère Thomas pour leur soutien mais surtout pour tous les moments passés ensemble comme les anniversaires, les concerts et match de rugby mettant ma thèse entre parenthèse. Enfin, je remercie mes parents d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir toujours encouragée à saisir les opportunités qui s'offraient à moi. Merci d'avoir été si compréhensifs et toujours présents à mes côtés, vous m'avez toujours appris à persévérer et je n'aurai pu y arriver sans votre soutien.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	7
TABLE DES MATIERES	9
TABLE DES FIGURES.....	12
ABREVIATIONS	14
RESUME.....	16
ABSTRACT	16
AVANT PROPOS.....	17
INTRODUCTION.....	19
Chapitre I : Les cellules microgliales.....	21
I. Historique et découverte des microglies	23
II. Les cellules microgliales au cours du développement	24
1. Origines des microglies.....	24
2. Colonisation des microglies dans le système nerveux central	26
3. Maturation des cellules microgliales vers un phénotype ramifié.....	27
4. Les cellules microgliales : une population hétérogène.....	28
a) Hétérogénéité spatiale	29
b) Hétérogénéité au sein d'une région, origine et conséquences.....	30
III. Expression de différents types de récepteurs à la membrane des microglies.....	31
1. Récepteurs nécessaires à l'activation microgliale : la signalisation ON/OFF.....	31
2. Récepteurs purinergiques	33
a) Récepteurs métabotropiques P2Y	33
b) Récepteurs ionotropiques P2X.....	34
c) Conversion de l'ATP en ADP par les ecto-nucléotidases.....	35
d) Récepteurs à l'adénosine.....	36
3. Récepteurs aux neuromodulateurs.....	36
a) Récepteurs dopaminergiques.....	36
b) Récepteurs à la norépinephrine	37
c) Récepteurs à l'acétylcholine.....	38
d) Récepteurs à l'histamine	39
e) Récepteurs à la sérotonine.....	39
IV. La motilité microgliale : une caractéristique clé pour les rôles des microglies	40
1. La surveillance microgliale	40
a) Surveillance à grande échelle via les prolongements.....	40
b) Surveillance à échelle nanométrique via les filopodes.....	42
2. Extension et convergence des prolongements microgliaux vers une lésion	42
3. Fonctions principales des cellules microgliales	44

a) Modulation de l'activité neuronale et des synapses	45
b) Régulation de la neurogénèse adulte	45
c) Phagocytose.....	46
d) Libération de facteurs solubles.....	47
e) L'élagage synaptique (« pruning » synaptique)	47
Chapitre II : Le système sérotoninergique dans le système nerveux central.....	49
I. Généralités.....	51
1. Découverte de la sérotonine et localisation.....	51
2. Métabolisme de la sérotonine.....	51
3. Distribution des neurones sérotoninergiques	52
II. Les récepteurs sérotoninergiques	54
1. Classification et couplage intracellulaire	55
2. Oligomérisation	57
a) Homodimères	57
b) Hétérodimères	57
III. Rôle de la sérotonine sur le système immunitaire	58
1. Système immunitaire périphérique.....	59
2. Système immunitaire du SNC	59
Chapitre III : Le récepteur 5-HT2B.....	61
I. Généralités.....	63
1. Structure du récepteur	63
2. Distribution anatomique et cellulaire	64
3. Pharmacologie.....	65
4. Couplages et voies de signalisation associées.....	65
5. Oligomérisation.....	67
II. Fonctions physiologiques et pathologiques du récepteur 5-HT2B	68
1. Au niveau périphérique	68
2. Au niveau du système nerveux central.....	69
OBJECTIFS DE LA THESE	73
RESULTATS	77
I - Méthode principale	79
Imagerie bi-photonique de la motilité des prolongements microgliaux.....	79
1. Contexte	81
2. Description du protocole	81
3. Contribution personnelle	82
II - Rôle du R-5-HT2B microglial dans la croissance orientée des prolongements microgliaux	83

1. Objectifs	84
2. Résultats principaux	85
3. Conclusions	86
4. Contribution personnelle	86
III - Étude de la potentielle dimérisation du récepteur 5-HT2B avec le récepteur purinergique P2Y12.....	87
I. Introduction	88
II. Notions de pharmacologie expérimentale	90
1. Détermination de l'affinité d'un récepteur pour son ligand (Kd, Ki)	90
2. Détermination de l'efficacité de couplage d'un récepteur (EC50).....	91
a) Définition de l'EC50 et principe de mesure.....	91
b) Principe de la détection des seconds messagers par FRET : exemple pour la mesure de l'efficacité du couplage Gq/PLC/IP3	91
III. Co-expression des récepteurs 5-HT2B et P2Y12 dans des cellules COS-7.....	93
IV. Détermination de l'affinité du récepteur 5-HT2B pour la 5-HT en présence du récepteur P2Y12	93
V. Détermination du couplage du récepteur 5-HT2B en présence du récepteur P2Y12 ..	94
IV - La fabuleuse histoire des DREADD dans les microglies	97
I. Introduction	99
II. Expression des récepteurs DREADD spécifiquement dans les microglies.....	100
III. Effets des ligands des DREADD sur la motilité des microglies	101
IV. Rôle du récepteur 5-HT2B dans la réponse microgliale à la Clozapine	104
DISCUSSION	107
ANNEXES	117
Annexe 1 : Régulation des microglies par les neuromodulateurs	119
1. Contexte	121
2. Contribution personnelle	121
Annexe 2 : Rôle du récepteur 5-HT2B dans la neuroinflammation induite par injection périphérique de LPS	123
1. Contexte	125
2. Résultats principaux	125
3. Conclusion.....	126
4. Contribution personnelle	126
BIBLIOGRAPHIE	127

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Découverte des cellules microgliales par Pio del Rio-Hortega	23
Figure 2: Développement cérébral et hématopoïèse	24
Figure 3: Colonisation et prolifération des microglies dans le parenchyme cérébral	26
Figure 4: Maturation des cellules microgliales vers un phénotype ramifié	28
Figure 5: Hétérogénéité des cellules microgliales dans le cerveau	29
Figure 6: Les propriétés intrinsèques des microglies conditionnent leur capacité à répondre à divers stimuli	30
Figure 7: Représentation de l'équilibre de la signalisation ON/OFF des cellules microgliales	31
Figure 8: Exemples de signaux et facteurs de l'activation microgliale	32
Figure 9: Régulation des fonctions microgliales par les neuromodulateurs	37
Figure 10: Schéma des récepteurs et canaux impliqués dans la surveillance microgliale à large échelle.....	41
Figure 11: Récepteurs impliqués dans l'attraction des prolongements des microglies	43
Figure 12: Les diverses fonctions des microglies en conditions physiologiques et pathologiques	44
Figure 13 : Métabolisme de la sérotonine dans le SNC. La sérotonine, après avoir été synthétisée à partir du tryptophane, est stockée dans les vésicules synaptiques.....	52
Figure 14: Distribution des neurones sérotoninergiques.....	53
Figure 15: Projections des neurones sérotoninergiques en fonction des noyaux du raphé	54
Figure 16: Couplage et voies de signalisation des récepteurs sérotoninergiques métabotropiques	55
Figure 17 : Voie de signalisation détaillée pour les récepteurs sérotoninergiques métabotropiques	56
Figure 18 : Topologie du récepteur 5-HT2B humain.....	63
Figure 19 : Détection de l'ARN messager du récepteur 5-HT2B par hybridation <i>in situ</i>	64
Figure 20 : Couplages et voies de signalisation associées au récepteur 5-HT2B	66
Figure 21 : Impact de l'hétérodimérisation des récepteurs 5-HT2A et 5-HT2B avec le récepteur 5-HT2C sur l'activation de la voie de signalisation Gq.	67

Figure 22: Principale voie de signalisation des récepteurs 5-HT2B et P2Y12 après stimulation respective à la 5-HT et à l'ATP.....	89
Figure 23: Modèle hypothétique de la dimérisation du récepteur 5-HT2B avec le récepteur P2Y12.....	89
Figure 24: Compétition de liaison de radioligand.....	90
Figure 25: Détermination du couplage d'un récepteur à la voie Gq-PLC-IP3.....	92
Figure 26: Immunohistochimie sur des cellules COS-7 transfectées avec les plasmides codant les récepteurs 5-HT2B-HA et P2Y12-Flag.....	93
Figure 27: La co-expression du récepteur P2Y12 dans les cellules COS-7 ne modifie pas l'affinité du récepteur 5-HT2B pour la 5-HT.....	94
Figure 28: La co-expression du récepteur 5-HT2B avec le récepteur P2Y12 ne change pas le couplage du récepteur 5-HT2B après stimulation à la sérotonine dans des cellules COS-7....	95
Figure 29: Schéma des différents récepteurs DREADD et leur signalisation.....	99
Figure 30: Génération des souris exprimant le récepteur hM3Dq spécifiquement dans les microglies.....	100
Figure 31: Vérification de l'expression des récepteurs DREADD hM3Dq dans les microglies par immunohistochimie.....	101
Figure 32: L'application du CNO induit la croissance orientée des prolongements des microglies dans des souris exprimant le récepteur hM3Dq dans les microglies mais également dans des souris sauvages.....	102
Figure 33: Les différents ligands des récepteur hM3Dq induisent une attraction des prolongements microgliaux en l'absence d'expression de ces récepteurs.....	103
Figure 34: La réponse microgliale R(t) est médiée aussi bien par le récepteur 5-HT2B microgliale que par le récepteur P2Y12.....	105
Figure 35: Aucun effet du récepteur 5-HT2B microglial sur l'activité antipsychotique aigue de la Clozapine.....	106

ABBREVIATIONS

5-HIAA	5-Hydroxyindoleacétique
5-HT	5-Hydroxytryptamine
5-HTP	5-Hydroxy-Tryptophane
AA	Acide Arachidonique
AADC	Décarboxylase des acides aminés aromatiques
AC	Adénylate Cyclase
Ach	Acétylcholine
ADP	Adénosine di-phosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ATP	Adénosine tri-phosphate
BRET	Bioluminescence Resonance Transfert Energy
CNO	Clozapine-N-oxide
CPM	Coups par minute
D21	DREADD Agonist 21
DAG	Diacylglycérol
DF	Dexfenfluramine
dLGN	Noyau latéral géniculé
DOI	1-[2,5-dimethoxy-4-iodophenyl]-2-aminopropane
DPM	Désintégration par minute
DR	Raphé Dorsal
DREADD	Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs
DRM	Raphé médian
DRN	Noyau du raphé dorsal
FRET	Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes
GFP	Green fluorescent protein
GIRK	Courant potassique rectifiant activé par les protéines G
HTAP	Hypertension artérielle pulmonaire
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
IP3	Inositol phosphate 3
ISRS	Inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine

Kd	Constante de dissociation
Ki	Constante d'inhibition
LPS	Lipopolysaccharide
MAO	Monoamine oxydase
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Enzyme de synthèse du monoxyde d'azote
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PDGFR	Récepteur des facteurs de croissance dérivés des plaquettes
PIP2	Phosphatidyl-Inositol-diphosphate
PKC	Protéine kinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RE	Réticulum Endoplasmique
RM	Raphé Médian
SALB	Salvinorine B
SERT	Transporteur membranaire de la sérotonine
SNC	Système Nerveux Central
SVZ	Zone sous ventriculaire
THC	Tétrahydrocannabinol
TLR	Toll-like receptor
TPH	Tryptophane Hydroxylase
VMAT	Transporteur vésiculaire des monoamines
VTA	Aire tegmentale ventral
VZ	Zone ventriculaire
YFP	Yellow fluorescent protein

RESUME

Les cellules microgliales forment la principale défense immunitaire du système nerveux central et possèdent une morphologie hautement ramifiée. Ces cellules sont également très motiles via leurs prolongements, leur permettant de constamment surveiller leur environnement et de répondre aux perturbations de l'homéostasie. Des études récentes ont montré que la sérotonine module la motilité des prolongements microgliaux mais son mécanisme d'action et la signalisation cellulaire impliquée sont encore inconnus. L'utilisation de souris n'exprimant pas le récepteur 5-HT2B spécifiquement dans les microglies nous ont permis de mettre en évidence sa participation dans la croissance orientée des microglies à une application locale de sérotonine. Cependant, cette réponse nécessite également la participation du récepteur purinergique P2Y12 via la mise en place d'un gradient d'ATP/ADP extracellulaire. De plus, nous avons observé la capacité des microglies à contacter spontanément, via leurs prolongements, des varicosités axonales des neurones sérotoninergiques. Ce résultat suggère ainsi un rôle des microglies dans la modulation de l'activité des neurones sérotoninergiques en condition physiologique. Dans une seconde étude, nous avons découvert que la clozapine, un antipsychotique atypique, module la morphologie des cellules microgliales et la motilité des prolongements microgliaux dépendamment du récepteur 5-HT2B. L'identification du rôle de ce récepteur microglial dans la réponse aux antipsychotiques atypiques ouvre de nouvelles perspectives dans l'étude des troubles psychiatriques tels que les troubles bipolaires et la schizophrénie.

ABSTRACT

Microglia cells are the main immune defense in the central nervous system and they have a high ramified morphology. Through their processes, these cells are very motile, allowing them to constantly survey their environment and to respond to homeostasis disruptions. Recent studies shown that serotonin modulates microglia processes motility but its mechanism is unknown. By using mice knock-out for the 5-HT2B receptor specifically in microglia, we highlighted its contribution in microglia processes oriented growth toward a local application of serotonin. Nonetheless, this response also requires P2Y12 receptor participation through the establishment of an extracellular ATP/ADP gradient. Further, we observed the ability of microglia to spontaneously contact, through their processes, serotonergic axonal varicosities. This result thus suggests a role of microglia on serotonergic neurons activity in physiological condition. In a second study, we discovered that clozapine, an atypical antipsychotic, modulates microglial morphology and microglial processes motility depending on the 5-HT2B receptor. The identification of the role of the microglial 5-HT2B receptor in the response to atypical antipsychotics opens up new perspectives in the study of psychiatric disorders such as bipolar disorder and schizophrenia.

AVANT PROPOS

Les microglies, macrophages résidents du cerveau, possèdent une morphologie hautement ramifiée et surveillent constamment leur environnement en projetant et rétractant leurs prolongements. La motilité des microglies leur permet d'interagir avec les neurones aussi bien en conditions physiologique que pathologique et de répondre rapidement à des perturbations de l'homéostasie. Par exemple, une lésion ou une application locale d'ATP induit une attraction des prolongements microgliaux, dépendant du récepteur P2Y12, et une application locale de glutamate active la libération d'ATP par les neurones, ce qui attire secondairement les prolongements microgliaux. Des études du laboratoire ont montré qu'une application locale de sérotonine (5-HT) induit également une rapide attraction des prolongements microgliaux.

Dans la partie principale de ma thèse, j'ai cherché à déterminer comment est médié l'effet de la 5-HT sur la croissance des prolongements microgliaux, et à déchiffrer les voies de signalisation impliquées. J'ai dans un premier temps optimisé la méthode d'observation et d'analyse de la motilité des prolongements des microglies par microscopie bi-photonique sur des tranches aiguës de cerveau. Dans un second temps, grâce à l'utilisation de souris invalidées pour le gène *Htr2b* dans les microglies uniquement, j'ai montré que l'attraction des prolongements microgliaux par la 5-HT nécessite le récepteur 5-HT2B microglial. De plus, j'ai démontré que l'ATP/ADP extracellulaire et le récepteur P2Y12 sont également nécessaires pour cette réponse microgliale, et j'ai testé plusieurs hypothèses afin d'expliquer l'implication de cette autre voie de signalisation. Enfin, j'ai observé sur des tranches aiguës de cerveau que les prolongements des microglies entrent en contact avec les varicosités des axones sérotoninergiques, ce qui suggère que l'attraction des prolongements microgliaux par la 5-HT pourrait se produire spontanément en conditions physiologiques.

Dans une deuxième étude, j'ai étudié les effets des antipsychotiques sur les microglies. En effet, notre objectif initial était de moduler les microglies en exprimant des récepteurs DREADD (Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs) dans les microglies. Cependant, lors des expériences contrôles, j'ai observé que leurs ligands telle que la clozapine, un antipsychotique utilisé en clinique, étaient attractifs pour les prolongements microgliaux. J'ai décidé de poursuivre mes recherches sur cet effet, montrant que la clozapine, comme la 5-HT, nécessite les récepteurs microgliaux 5-HT2B et P2Y12 pour attirer les prolongements microgliaux.

Dans l'ensemble, mes résultats montrent que le récepteur 5-HT2B permet aux microglies de détecter et de répondre à la 5-HT, et que cette réponse implique des voies de signalisation purinergiques. Des observations préliminaires suggèrent que les prolongements microgliaux entrent en contact spontanément avec les fibres sérotoninergiques et que cet effet pourrait donc être important dans le développement normal ou la régulation des microglies, et d'autres études sont en cours afin d'étudier le rôle du récepteur 5-HT2B dans le contrôle des fonctions microgliales.

INTRODUCTION

Chapitre I : Les cellules microgliales

I. Historique et découverte des microglies

Les microglies ont été décrites pour la première fois en 1856 par l'Allemand Rudolf Virchow les identifiant comme étant la « neuroglie » du cerveau, représentant une substance adhésive connectant les neurones entre eux (Virchow, 1856). En 1897, Ramón y Cajal publia le premier article proposant que son rôle principal est de préserver les circuits neuronaux et d'empêcher les contacts dits inappropriés (Ramón y Cajal, 1897). Quelques années plus tard, Nicolás Achúcarro, collègue et ancien étudiant de Cajal, a commencé à s'intéresser à la neuroglie et plus particulièrement à des cellules de forme allongée, les « rod cells », un type de cellules découvert en 1898 par Franz Nissl. Il a pu visualiser ces cellules chez le lapin infecté par le virus de la rage et a observé que la forme de ces cellules était adaptée à celle des neurones et étaient localisées autour des foyers nécrotiques au niveau de l'hippocampe. Ces cellules étaient remplies de « produits de dégénérescence graisseuse ». De par leur morphologie et leur contenu, Nicolás Achúcarro émit l'hypothèse que ces cellules étaient capables de phagocyter les neurones en dégénérescence et devaient leur morphologie allongée à un mouvement actif entre ces neurones (Achúcarro, 1909). Cependant, grâce au développement de nouvelles techniques de marquage et d'imprégnation du tissu, il fut capable de décrire et de différencier deux types cellulaires appartenant à la neuroglie : les cellules allongées capables de phagocytose, granulaires et « graisseuses » et les cellules étoilées fibreuses, que nous appelons aujourd'hui respectivement microglies et astrocytes (Achúcarro, 1913).

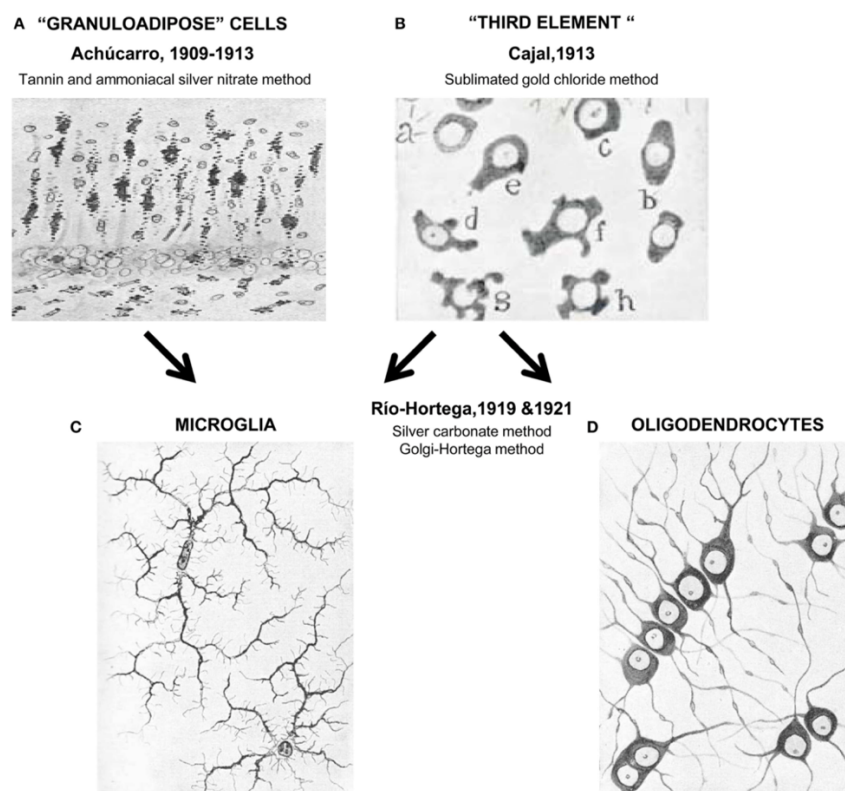


Figure 1 : Découverte des cellules microgliales par Pio del Rio-Hortega. Depuis la découverte des cellules adipeuses granulaires par Achúcarro (A) et du « 3^{ème} élément » par Cajal (B), Rio-Hortega a pu faire la distinction des microglies (C) des oligodendrocytes (D) en optimisant les techniques d'imprégnation de tissu (Tremblay et al., 2015).

Cependant, en parallèle des études de Nicolás Achúcarro, Ramón y Cajal parlait lui de « troisième élément » en opposition aux neurones et aux cellules étoilées (**Figure 1**). Il s'oppose à son ancien étudiant en décrivant ces cellules comme étant des cellules gliales petites, de la substance blanche, sans processus et apolaires. Ce n'est que peu de temps après que l'ancien étudiant d'Achúcarro, Pio del Rio-Hortega, développa une nouvelle méthode de marquage permettant d'observer la morphologie complexe de ces cellules lui permettant ainsi de distinguer deux types cellulaires : les oligodendrocytes et les microglies (Rio-Hortega 1919).

Bien que la neuroglie ait été décrite en 1856, il a donc fallu plus de soixante ans pour que finalement, grâce à l'utilisation de plusieurs méthodes de marquage et d'imprégnation, Pío del Rio-Hortega y distingue un nouveau type cellulaire et « découvre » les microglies en 1919.

II. Les cellules microgliales au cours du développement

1. Origines des microglies

Lors de la découverte des microglies, ces cellules étaient décrites comme étant d'origine neuroectodermique comme les autres cellules gliales résidentes du système nerveux central (SNC) ou encore les neurones. Cependant, les microglies font partie de la famille des macrophages et du système immunitaire et comme ces cellules, les microglies se différencient à partir des précurseurs hématopoïétiques provenant du tissu mésodermique. Il existe deux types d'hématopoïèse dans l'embryon de souris : la primitive et la définitive.

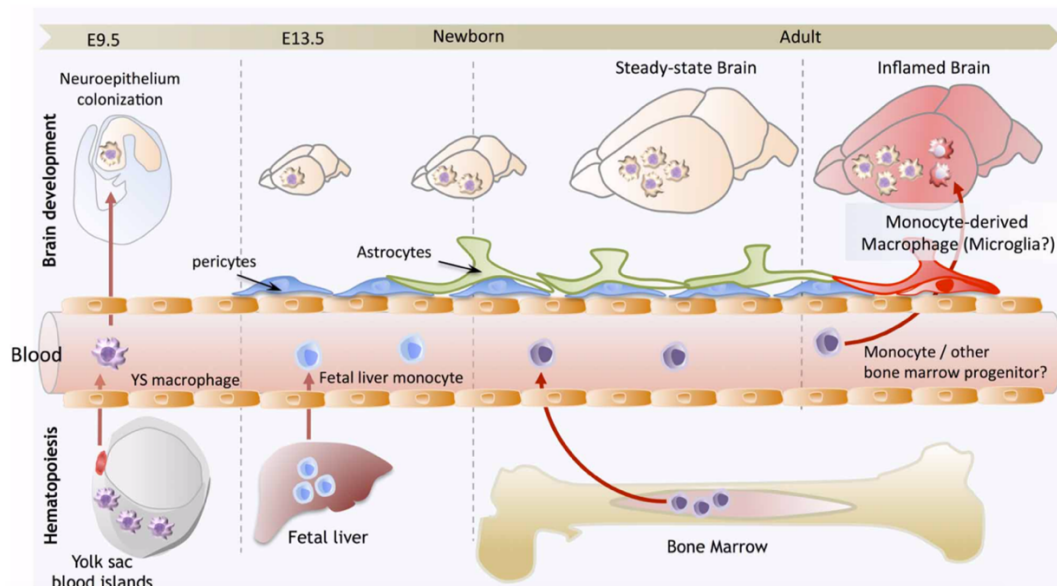


Figure 2: Développement cérébral et hématopoïèse. Les cellules microgliales proviennent du sac vitellin lors de l'hématopoïèse primitive et atteignent le SNC grâce à la circulation sanguine (Ginhoux et al., 2013).

L'hématopoïèse primitive se déroule dans le sac vitellin extra-embryonnaire vers E7 et produit les macrophages et érythrocytes. Une fois la circulation sanguine mise en place, les macrophages primitifs produits se propagent via les vaisseaux, qu'ils quittent afin de coloniser différents tissus tels que le SNC. L'hématopoïèse primitive décroît au cours du développement et est remplacée par l'hématopoïèse définitive qui se déroule dans le foie fœtal et produit toutes les cellules hématopoïétiques jusqu'à la naissance. Les progéniteurs produits à ce stade ne peuvent cependant plus coloniser le SNC du fait de la barrière hémato-encéphalique devenue imperméable aux cellules (**Figure 2**).

En 1999, les travaux de l'équipe de Pessac ont permis de montrer que les microglies dérivent des cellules du sac vitellin. Pour ce faire, ils ont observé la présence des précurseurs des cellules microgliales tout d'abord dans le sac vitellin puis dans le cerveau à partir de E8, via l'expression de marqueurs tels que F4/80 et CD11b (Alliot et al., 1999). Ces expériences ne permettaient cependant pas de dire si la population microgliale s'enrichissait ou pas de cellules issues d'une hématopoïèse plus tardive.

L'émergence des techniques pour marquer des cellules à des temps précis et donc suivre des lignages cellulaires ont permis de comprendre la contribution des cellules hématopoïétiques produites à différentes étapes dans la formation de la population microgliale. Des apports importants sont venus de l'utilisation d'une lignée de souris exprimant, sous le contrôle du promoteur Runx1 (Runt-related transcription factor 1), une Cre recombinase activable par le tamoxifène. Runx1 est exprimé dès E7.5 dans le sac vitellin (Samokhvalov et al., 2007) ce qui permet de marquer des progéniteurs de la première vague d'hématopoïèse. Cette lignée de souris a été croisée avec la lignée rapportrice ROSA26-Stop-EYFP, permettant ainsi de suivre le devenir des cellules recombinées par l'expression de la YFP. L'induction de la Cre recombinase par injection de tamoxifène à E7.5 permet d'observer l'expression de la YFP dans 30% des macrophages du sac vitellin. En étudiant le cerveau des embryons à différents stades du développement, il a été montré qu'on observe également une expression de la YFP dans 30% des microglies, à E10 et E13 mais également à 6 semaines (Ginhoux et al., 2010). Le fait que les taux de recombinaison soient identiques dans le sac vitellin et, plus tard, parmi la population des microglies suggère que toutes les microglies sont issues des précurseurs ayant recombiné à E7.5. En effet, s'il y avait d'autres précurseurs, formés ultérieurement, qui colonisaient le cerveau, ils ne seraient pas marqués et le pourcentage de cellules YFP-positives devrait diminuer. D'ailleurs, si l'activation de la Cre recombinase est induite à E8.5, il n'y a quasiment pas (moins de 5%) de microglies YFP-positives donc recombinées dans le cerveau adulte, alors qu'on observe un fort taux de recombinaison dans les monocytes et les macrophages périphériques.

Ces résultats montrent donc que la microglie adulte dérive exclusivement des progéniteurs de l'hématopoïèse primitive du sac vitellin et non pas des vagues ultérieures d'hématopoïèse.

2. Colonisation des microglies dans le système nerveux central

Une fois les progéniteurs des cellules microgliales produits dans le sac vitellin, ils vont commencer à entrer dans le parenchyme cérébral via la circulation sanguine à partir de E8.5 (Ginhoux et al., 2010) et jusqu'à E14.5 (Stremmel et al., 2018). Les précurseurs des microglies colonisent le SNC par deux mécanismes complémentaires : la migration et la prolifération (Figure 3).

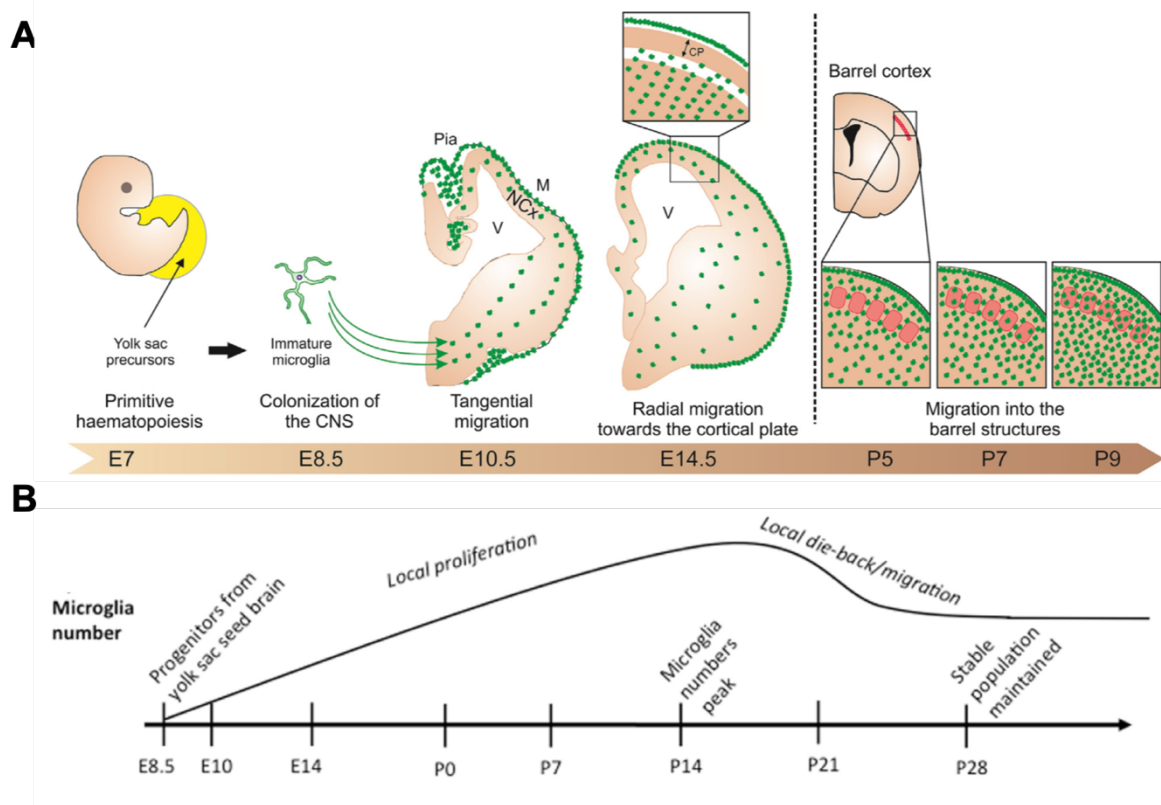


Figure 3: Colonisation et prolifération des microglies dans le parenchyme cérébral. (A) Suivi de la prolifération des microglies durant l'embryogénèse jusqu'à la période postnatale (Mosser et al., 2017). (B) Schéma de l'évolution du nombre de microglies à partir de l'embryogénèse jusqu'à l'âge adulte (Lenz and Nelson, 2018).

Les progéniteurs des microglies expriment dès E9.5 le gène codant pour le récepteur Csf1 (Colony-Stimulating Factor 1) (Ginhoux et al., 2010) et ce dernier permet leur recrutement vers les régions prolifératives du cerveau : la zone sous-ventriculaire (SVZ) et la zone ventriculaire (VZ). A ce stade, la répartition des microglies dans le cerveau est encore inégale (Figure 3A). En effet, lorsque les microglies colonisent le SNC, elles se concentrent au niveau de trois sites spécifiques dans le parenchyme cérébral embryonnaire, appelées les « fontaines de microglies » par Pio del Rio-Hortega : une région proche du troisième ventricule, la pie-mère et une région proche du quatrième ventricule. La migration des cellules microgliales suit un modèle spatio-temporelle dépendant de leur voie d'entrée et se réalise en deux phases. La première phase consiste en une migration tangentielle le long de la surface du cerveau pour se répartir en une couche uniforme (Cuadros and Navascués, 2001; Pont-Lezica et al., 2011). Arrive ensuite la phase de migration radiale lors de laquelle les microglies migrent

perpendiculairement à la surface du SNC ce qui leur permet d'atteindre toutes les couches du parenchyme cérébral.

Une fois l'entrée des microglies dans le parenchyme cérébral, leur prolifération se met en place. Les microglies prolifèrent au cours des deux dernières semaines prénatales jusqu'à la deuxième semaine postnatale et le nombre de microglies atteint son maximum à P14 puis diminue pour être stable à l'âge adulte (**Figure 3B**) (Bennett et al., 2016; Kim et al., 2015; Nikodemova et al., 2015).

3. Maturation des cellules microgliales vers un phénotype ramifié

Après avoir colonisé le parenchyme cérébral et atteint leur emplacement définitif, les cellules microgliales vont passer d'une morphologie de type amiboïde à une morphologie ramifiée, caractéristique des microglies en conditions physiologiques dans le cerveau adulte (**Figure 4**). Les mécanismes impliqués dans cette évolution de la morphologie au cours du développement sont encore peu connus. Néanmoins, la présence des astrocytes semble jouer un rôle important. En effet, *in vitro*, la mise en culture des cellules microgliales sur un tapis astrocytaire permet le développement de leur ramification (Sievers et al., 1994), ce qui a pu être reproduit par le simple ajout de facteurs solubles dérivés des astrocytes tels que des cytokines (TGF- β , M-CSF et GM-CSF), sans sérum dans le milieu (Tanaka and Maeda, 1996) ou une combinaison de cholestérol et de cytokines (TGF- β 2 et IL-34 ou CSF-1, tous les deux étant des ligands de CSFR-1) (Bohlen et al., 2017). Des études plus récentes *in vivo* ont montré que le niveau de ramification des prolongements des microglies dans le cerveau adulte est sous le contrôle de la signalisation purinergique (Matyash et al., 2017), et la transformation d'une forme amiboïde vers une forme ramifiée ne commencerait que lorsque le facteur de transcription Runx1 disparaît, vers P10 (Zusso et al., 2012). Les microglies arborent leur ramification définitive aux alentours de quatre semaines de vie postnatale (P28), chez la souris (Pour revue Nayak, Roth and McGavern, 2014).

D'autre part, la maturation fonctionnelle, via les propriétés électrophysiologiques des cellules microgliales, coïncide avec l'augmentation de la ramification des microglies. En effet, les microglies embryonnaires amiboïdes de souris, de morphologie amiboïde, possèdent un courant potassique K^+ entrant qui diminue au cours de la maturation post-natale et change temporairement vers un courant sortant de K^+ . Les facteurs solubles dérivés des astrocytes tels que le TGF- β sont connus pour contrôler la régulation à la hausse des courants sortants potassiques (Schilling et al., 2001). La fonction de ces courants potassiques voltage-dépendant médiée par les canaux Kv1.3 dans la microglie embryonnaire de la souris est encore non-élucidée mais peut contenir un mécanisme de désactivation et donc participer à l'augmentation de la ramification des microglie (Schilling et al., 2000).

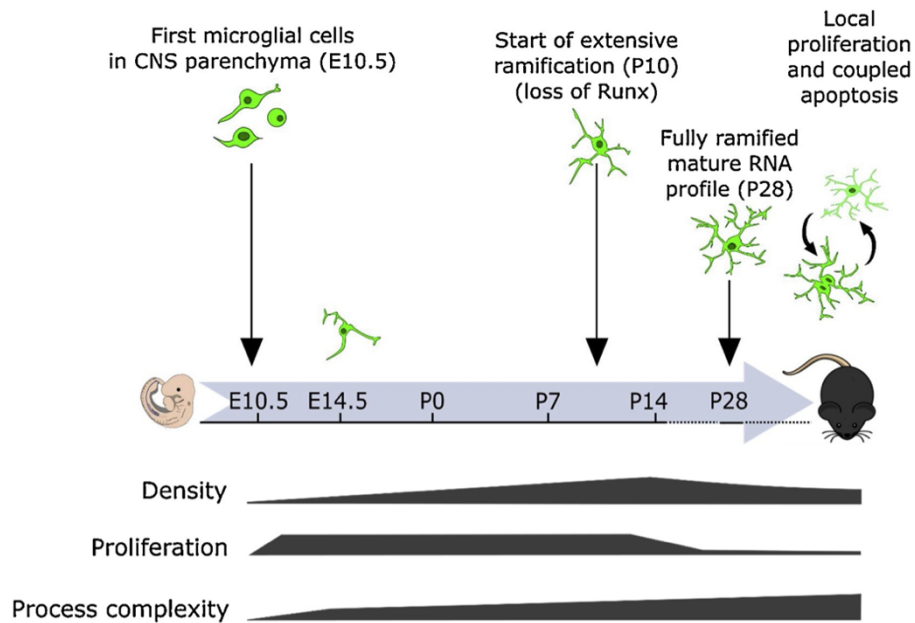


Figure 4: Maturation des cellules microgliales vers un phénotype ramifié. Les cellules microgliales possèdent une morphologie amiboïde lorsqu'elles colonisent le SNC et commencent à acquérir une ramification plus importante vers P10. Les microglies arborent leur ramification maximale à P28. Illustration adaptée de Smolders 2019 (Smolders et al., 2019).

Ainsi, la maturation des cellules microgliales au cours du développement vers une morphologie hautement ramifiée est sous-tendue par des changements d'expression des gènes et de ce fait, on observe des changements détectables concernant les propriétés électrophysiologiques des microglies ainsi que leurs fonctions telles que la phagocytose.

4. Les cellules microgliales : une population hétérogène

Pendant de longues années, les cellules microgliales dans un cerveau adulte ont été considérées comme formant une population cellulaire homogène. Cependant, grâce à l'essor des analyses transcriptomiques par séquençage d'ARN (RNAseq) de masse ou unicellulaire (single-cell RNAseq), de l'imagerie qui permet de reconstruire la structure des microglies et de mesurer de nombreux paramètres morphologiques, et de l'analyse statistique qui permet d'identifier des sous-populations à partir de données multidimensionnelles, il est devenu évident qu'au sein d'un même animal, ces cellules peuvent présenter des signatures diverses au niveau de leur morphologie, leur densité et l'expression des gènes et protéines. L'hétérogénéité existe d'une région à l'autre du SNC mais aussi au sein d'une région donnée. Cela a fait l'objet de plusieurs revues ces dernières années (De Biase and Bonci, 2019; Stratoulis et al., 2019; Tan et al., 2019), et je vais résumer les principaux résultats.

a) Hétérogénéité spatiale

D'une région à l'autre du SNC, les microglies peuvent différer par leur densité, leur morphologie ou leur signature moléculaire (**Figure 5**). En effet, bien que les cellules microgliales soient omniprésentes dans le SNC, plusieurs études basées sur l'immunocytochimie (Lawson et al., 1990; Sharaf et al., 2013) mais aussi plus récentes en utilisant des marqueurs fluorescents exprimés par des souris transgéniques (De Biase et al., 2017; Stowell et al., 2018), ont montré des différences régionales concernant la densité des cellules microgliales. Des densités similaires de microglies ont ainsi été observées dans le cortex, le striatum et l'hippocampe tandis que la densité est deux fois plus faible dans le thalamus et le mésencéphale et encore plus faible dans le cervelet. Les cellules microgliales semblent donc être globalement plus abondantes dans les régions rostrales et dorsales que ventrales et caudales (De Biase and Bonci, 2019).

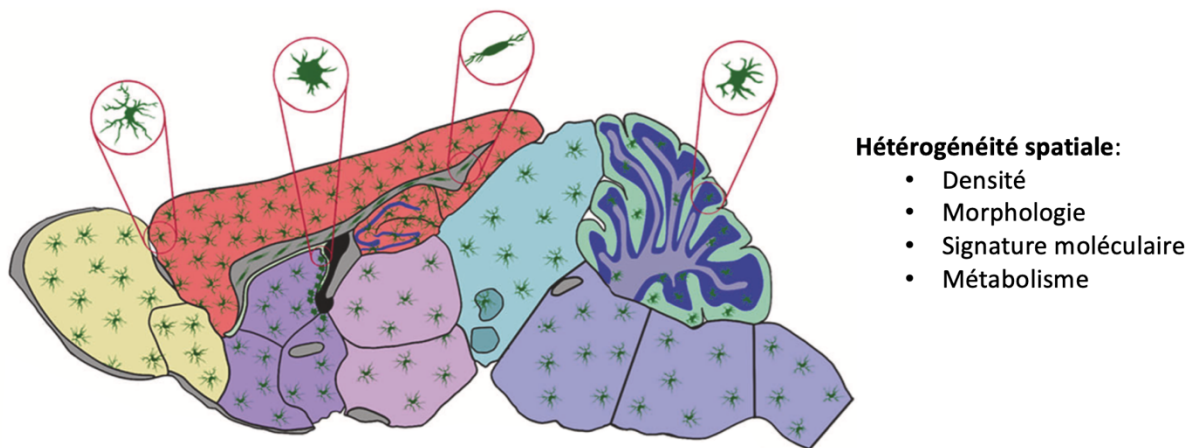


Figure 5: Hétérogénéité des cellules microgliales dans le cerveau. Les microglies sont présentes dans tout le parenchyme cérébral mais elles diffèrent selon leurs localisations par leur densité, morphologie et l'expression des gènes. Illustration adaptée de Tan 2019 (Tan et al., 2019).

Dans le SNC en conditions physiologiques, les microglies arborent une morphologie hautement ramifiée avec des prolongements motiles (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). Plusieurs études ont mis en évidence une diversité au niveau morphologique des cellules microgliales dépendante de leur localisation dans le cerveau (De Biase et al., 2017; Savchenko et al., 2000; Sharaf et al., 2013) (Stowell et al., 2018). Les différences concernent principalement le degré de ramification, avec une ramification plus complexe des microglies dans les régions corticales, striatales et hippocampiques que dans le thalamus, le cervelet et la moelle épinière. Les mécanismes sous-tendant cette hétérogénéité sont encore peu connus, mais on peut penser que des différences régionales de densité en corps cellulaires, dendrites et axones, ou encore de vaisseaux sanguins peuvent avoir une influence. Ces changements de morphologie ont potentiellement des implications fonctionnelles car la capacité des microglies à surveiller leur environnement et à répondre à différents stimuli est liée au degré de ramification de leurs prolongements.

Enfin, l'identité microgliale varie d'une région à une autre au niveau des gènes exprimés. Une variation de l'expression des marqueurs protéiques de surface typiques des microglies (CD11b, CD40, CD45, CD80, CD86, F4/80, TREM2B et CX3CR1), en fonction des régions d'origine, avait été mise en évidence il y a une dizaine d'années par cytométrie en flux (de Haas et al., 2008). Cette idée a été récemment largement développée grâce à des études transcriptomiques de microglies isolées à partir de différentes régions du cerveau, à l'âge adulte (De Biase et al., 2017; Butovsky et al., 2014; Grabert et al., 2016; Masuda et al., 2019). Il faut cependant préciser que les différences sont subtiles et que les variations d'expression d'une région à une autre reflètent sans doute des proportions différentes de sous-types microgliaux (Masuda et al., 2019).

b) Hétérogénéité au sein d'une région, origine et conséquences

Indépendamment de la variabilité régionale, on peut aussi définir des sous-types des microglies sur la base des profils de séquençage d'ARN des cellules individuelles (Keren-Shaul et al., 2017; Masuda et al., 2019; Matcovitch-Natan et al., 2016a), et ces sous-types sont plus ou moins représentés suivant l'âge, la région, l'état pathologique ou physiologique. Il y a donc une hétérogénéité même entre microglies voisines, qui suggère que toutes les microglies n'ont pas les mêmes fonctions et rôles (pour revue (Stratoulis et al., 2019)). La grande diversité des états « d'activation » que l'on peut observer dans les microglies en fonction des stimuli, de l'âge, des pathologies, ne reflèterait donc pas une plasticité exceptionnelle de chaque microglie (idée « traditionnelle » **Figure 6A**). Au contraire, cela serait dû au fait qu'en fonction de leur localisation, leur morphologie et leur profil transcriptionnel, certaines microglies, mais pas d'autres, répondent à tel ou tel stimulus (**Figure 6B**).

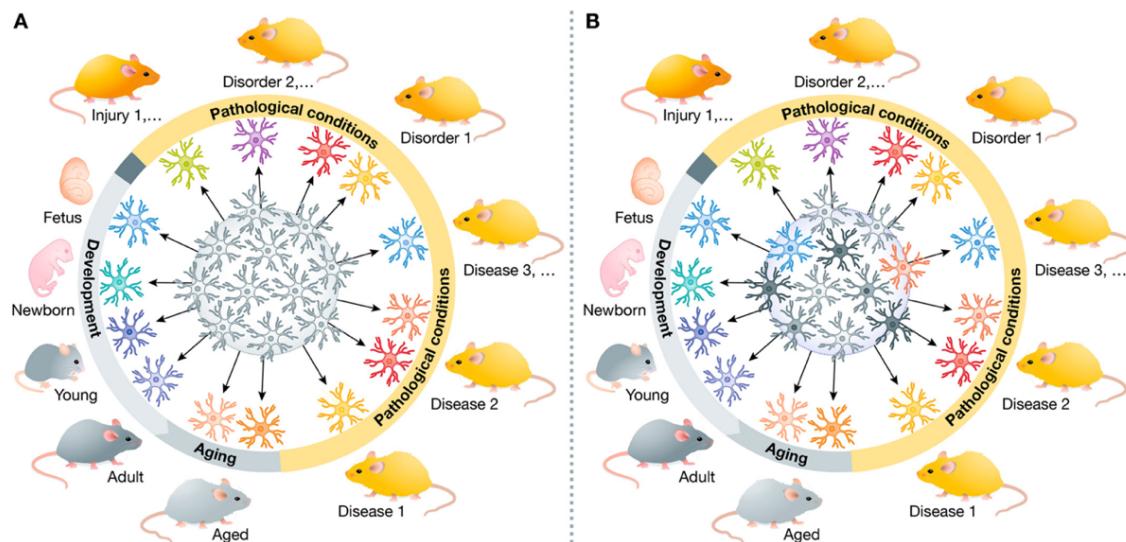


Figure 6: Les propriétés intrinsèques des microglies conditionnent leur capacité à répondre à divers stimuli. (A) Vision d'une population cellulaire de microglies homogène mais très plastique (au centre, toutes les microglies sont identiques) répondant différemment selon les stimuli. (B) Vision d'une population hétérogène de microglies, chacune ayant des propriétés intrinsèques et fonctionnelles définies (au centre, plusieurs couleurs de microglies), avant tout stimulus. Dans ce modèle, tous les sous-types de microglies ne répondent pas à tous les stimuli (Stratoulis et al., 2019).

L'origine de cette hétérogénéité entre les microglies n'est pas connue : elles pourraient, dès la période embryonnaire, avoir une identité propre les conditionnant pour répondre à certains stimuli selon les gènes exprimés, ou acquérir des propriétés spécifiques en fonction d'interactions avec d'autres cellules et facteurs lors de leur migration et ou leur maturation, localement.

III. Expression de différents types de récepteurs à la membrane des microglies

1. Récepteurs nécessaires à l'activation microgliale : la signalisation ON/OFF

En conditions physiologiques, les microglies sont dans un état de quiescence et possèdent une morphologie ramifiée. Ces cellules expriment un grand nombre de récepteur à leur membrane leur permettant de répondre à différents types de signaux. Parmi eux, il existe des signaux ON/OFF dont les effets sont opposés mais dans un état d'équilibre en conditions physiologiques, ce qui maintient les microglies dans un état de quiescence. Lors d'un processus inflammatoire, cet équilibre des signaux ON/OFF est rompu et les signaux ON prédominent sur les signaux OFF, induisant des changements morphologiques des microglies vers un phénotype amiboïde et l'activation microgliale (**Figure 7**). Les cytokines jouent un rôle important dans l'activation microgliale mais on distingue cependant deux types de signaux : la signalisation ON et la signalisation OFF (Biber et al., 2007; Hanisch and Kettenmann, 2007). L'expression des cytokines inflammatoires est induite lors de conditions inflammatoires (signal ON) alors que l'expression des cytokines homéostatiques est constitutive (signal OFF) et le simple arrêt de la production des cytokines homéostatiques provoque l'activation des microglies.

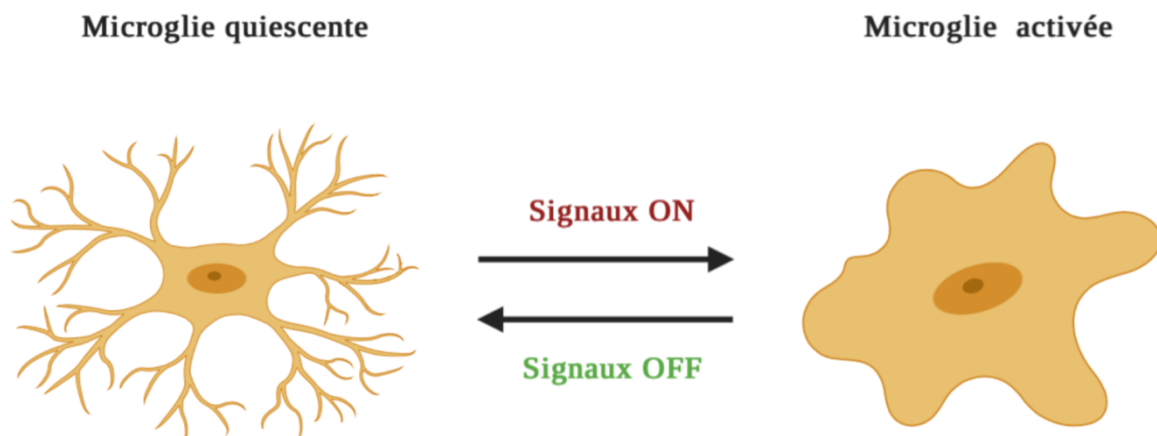


Figure 7: Représentation de l'équilibre de la signalisation ON/OFF des cellules microgliales. En conditions physiologiques, les signaux ON/OFF sont maintenus à l'équilibre ce qui permet de maintenir les microglies dans un état quiescent. Lors d'une perturbation de l'environnement des microglies, les signaux ON prédominent sur les signaux OFF engendrant l'activation des cellules microgliales.

La signalisation ON comprend différents types de signaux : protéines endogènes anormales, des anticorps, des composants plasmatiques, des pathogènes mais également des cytokines (**Figure 8**).

Catégories de signaux	Exemples
<i>Structures de surface, ADN/ARN d'origine virale, bactérienne ou fongique</i>	Agonistes des membres de la famille des récepteurs à reconnaissance de motifs TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR6/2 et TLR9, comme le LPS ou les protéoglycanes ou acide lipotéichoïque de la membrane bactérienne, les protéines gp41 et gp120
<i>Protéines endogènes anormales</i>	Agrégats de protéines β -amyloïde, fragments A β (25-35), A β 40, A β 42, protéine Prion (PrP)
<i>Complément</i>	Facteurs du complément C1q et C5a
<i>Anticorps</i>	Immunoglobulines de différentes classes et sous-types (IgA, IgG, IgM) présentes au niveau de complexes immunitaires
<i>Cytokines</i>	M-CSF, GM-CSF, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- γ , TGF- β , TNF- α
<i>Chimiokines</i>	Ligands des récepteurs chimiokines : CCR3, CCR5, CXCR2, CXCR, CXCR4, CX3CR1, IL-8R
<i>Facteurs neurotrophiques</i>	BDNF (Brain-derived neurotrophic factor), GDNF (glial-derived neurotrophic factor), NGF (nerve growth factor), NT-3 (neurotrophin 3), NT-4
<i>Composants plasmatiques</i>	Albumine, fibronectine, fibrinogène, thrombine
<i>Autres protéines et peptides</i>	Apolipoprotéine E (ApoE), hsp60, hsp70 (Heat shock protein), CD40L, MSH (melanocyte-stimulating hormone), endothéline, protéine S100, VIP (vasoactive intestinal peptide)
<i>Composés liés à la neurotransmission</i>	ATP (et autres purines), agonistes β -adrénergiques, glutamate, kaïnate, NMDA, 5-HT
<i>Ions</i>	K ⁺ , Mn ²⁺
<i>Autres composés</i>	Cannabinoïdes, céramide, gangliosides, acide lysophosphatidique (LPA), mélatonine, opioïdes (endomorphines), PAF (platelet-activating factor), prostaglandine E2 (PGE2), hormones stéroïdes, vitamine D3

Figure 8: Exemples de signaux ON de l'activation microgliale. Tableau tiré de la revue de (Hanisch and Kettenmann, 2007).

Les signaux « ON » correspondent à l'apparition de facteurs dits inhabituels : des structures bactériennes (LPS) ou virales (ARN double brin), la libération en grande quantité de facteurs solubles (ATP, cytokines), des lésions tissulaires ou encore l'agrégation de protéines. Les microglies expriment notamment à leur surface des récepteurs à reconnaissance de motifs, tels que les récepteurs Toll-like (TLRs), permettant de détecter et de différencier les structures

virales, bactériennes et fongiques (Olson and Miller, 2004; Trinchieri and Sher, 2007). En effet, les bactéries expriment à leur surface une endotoxine le lipopolysaccharide (LPS), qui va être reconnu par le récepteur TLR4 présent à la membrane des microglies.

Les signaux « OFF » possèdent un effet « calmant » sur l'état d'activation des microglies et sont nécessaires pour éviter un emballement de l'activation microgliale. Parmi ces signaux, on retrouve les neurotransmetteurs qui témoignent d'une activité neuronale normale, dont l'expression de leurs récepteurs par les microglies est expliquée plus en détail ci-dessous. Il existe d'autres récepteurs que l'on associe à cette signalisation « OFF » car leur délétion provoque l'activation des cellules microgliales : CD200R et CX3CR1, qui reconnaissent respectivement les protéines neuronales CD200 et CX3CL1 (Barclay et al., 2002; Cardona et al., 2006). CD200 est exprimée à la surface des neurones. La chimiokine CX3XL1 ou Fractalkine peut être en revanche soit exprimée en surface soit libérée par les neurones, sans que l'on sache encore si une forme ou l'autre est plus efficace sur l'état d'activation des microglies. On peut faire remarquer ici que le récepteur CX3CR1 est un marqueur des cellules microgliales qui permet de les distinguer des autres cellules du cerveau. Plusieurs souris transgéniques ont de ce fait été générées en introduisant de séquences (codant la protéine GFP ou la recombinase activable par le tamoxifène CreER) en aval du promoteur du gène *Cx3cr1*, et utilisées pour étudier les microglies (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005; Parkhurst et al., 2013).

2. Récepteurs purinergiques

L'adénosine triphosphate (ATP) possède un rôle majeur dans les fonctions des microglies et est majoritairement assimilé à des lésions tissulaires ou encore à la mort cellulaire. Les récepteurs purinergiques reconnaissent l'ATP ainsi que ces dérivés ADP, AMP et adénosine et sont regroupés en deux grands groupes : les récepteurs P1 (A1, A2A, A2B et A3) activés par l'adénosine et les récepteurs P2 activés aussi bien par l'ATP que par l'adénosine. Les récepteurs P2 comprennent des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G P2Y et des récepteurs ionotropiques P2X.

a) Récepteurs métabotropiques P2Y

L'activation des récepteurs P2Y induit des cascades intracellulaires impliquées dans différentes fonctions microgliales telles que la motilité, la phagocytose ou encore la libération de cytokines (*expliqué plus en détails dans la partie IV*). On recense actuellement trois de ces récepteurs exprimés par les microglies : les récepteurs P2Y6, P2Y12 et P2Y13.

L'expression du récepteur P2Y6 dans les microglies a tout d'abord été montré dans des cultures primaires de microglies où activation par l'Uridine di-phosphate (UDP) provoque la phagocytose (Koizumi et al., 2007), puis a été confirmée plus tard *in vivo* (Neher et al., 2014). Le récepteur P2Y6 est couplé à une protéine G α_q et son activation augmente la concentration

intracellulaire d'inositol phosphate (IP3), via la phospholipase C (PLC), ce qui induit la libération de Ca^{2+} par le réticulum endoplasmique. Bien connu pour son rôle dans la phagocytose, des études récentes ont mis en évidence la participation du récepteur P2Y6 dans la neuroinflammation. En effet, le traitement au LPS déclenche la libération d'UDP permettant la production et la libération de cytokines inflammatoires (Yang et al., 2017). L'UDP est considéré comme le ligand spécifique endogène du récepteur P2Y6 et son activation lors de lésions tissulaires est un facteur important dans les réactions inflammatoires (Liu et al., 2009).

Le récepteur P2Y12 est considéré comme un marqueur des microglies ramifiées en conditions physiologiques (Mildner et al., 2017). Son expression est d'ailleurs régulée à la baisse pendant l'activation microgliale (Haynes et al., 2006). Il est couplé à la protéine G α_i et l'activation de ce récepteur va inhiber l'adénylate cyclase (AC) et diminuer la concentration intracellulaire d'AMPc. Le récepteur P2Y12 est principalement connu pour être impliqué dans la motilité directionnelle des prolongements microgliaux qui peut s'effectuer lors de la mort cellulaire grâce à la libération massive d'ATP. Le mécanisme d'action est décrit plus en détail dans la partie IV.

b) Récepteurs ionotropiques P2X

Les principaux récepteurs ionotropiques exprimés par les microglies sont les récepteurs P2X4 et P2X7. Ces récepteurs sont des canaux cationiques trimériques dont l'ouverture est déclenchée par l'ATP. Dans les cultures de microglies, la stimulation avec l'ATP provoque deux courants antagonistes : un courant dépolarisant dépendant des récepteurs P2X et un courant potassique dépendant des récepteurs P2Y.

Le récepteur P2X4 possède une forte perméabilité au calcium pouvant conduire à la dépolarisation de la cellule. Le rôle de ce récepteur dans les microglies en conditions physiologiques n'est pour le moment pas établi. Il est induit dans différentes conditions pathologiques. Des études *in vivo* ont ainsi montré une régulation à la hausse du récepteur P2X4 dans les microglies au niveau de la moelle épinière ou du parenchyme cérébral en cas de lésion (Tsuda et al., 2003; Zhang et al., 2006) à la suite d'un traitement antagoniste nicotinique dans un modèle d'hyperalgésie induite (Zhang et al., 2017), dans la douleur neuropathique (Gong et al., 2009), et en cas de status epilepticus (Ulmann et al., 2013). Cette augmentation de l'expression de P2X4 dans les microglies contribuerait activement à des modifications neuronales observables dans des modèles de douleurs (Gong et al., 2009). D'ailleurs, dans un modèle de douleurs neuropathique, le blocage pharmacologique du récepteur P2X4 réduit les comportements liés à la douleur des animaux (Jurga et al., 2017), et des souris invalidées pour le gène codant P2X4 sont insensibles à certaines formes de douleurs (Ulmann et al., 2008).

Les récepteurs ionotropiques P2X7 sont couplés à des canaux cationiques pouvant laisser entrer les ions Na^+ et Ca^{2+} ou laisser sortir les ions K^+ . Ces récepteurs ne sont sensibles qu'à des concentrations élevées de ligands, de l'ordre du millimolaire pour l'ATP et sont donc silencieux en conditions physiologiques. Le récepteur P2X7 est exprimé dans les microglies *in vitro* (He 2017) mais également *in vivo* (Masuch et al., 2016) et son expression est régulée à la

hausse lors de l'activation microgliale (Avignone et al., 2008; Rappold et al., 2006) jouant ainsi un rôle important dans les processus inflammatoires via la libération de cytokines. En effet, des injections de LPS, aussi bien en périphérie que dans le cerveau, induisent une augmentation de l'expression du récepteur P2X7 dans les microglies provoquant la libération de molécules toxiques tels que l'oxyde nitrique (NO) et les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (Choi et al., 2007). D'autres études ont révélé que l'activation du récepteur P2X7 microglial induit une importante libération d'ATP dans le milieu extracellulaire ainsi que la formation de l'inflammasome NLRP3. Ce dernier induit la cascade inflammatoire en activant la caspase 1, résultats observés aussi bien *in vitro* que *in vivo* (He et al., 2017; Yue et al., 2017). La caspase 1 va permettre la libération de la cytokine IL-1 β (Shieh 2014). D'autre part, l'activation du récepteur P2X7 par l'ATP provoque la production et la libération d'une autre cytokine pro-inflammatoire, le TNF α (Inoue et al., 2007).

Ainsi, les récepteurs P2X4 et P2X7 sont tous les deux impliqués dans les processus inflammatoires qui coïncident avec des concentrations extracellulaires d'ATP élevées.

c) Conversion de l'ATP en ADP par les ecto-nucléotidases

L'ATP extracellulaire dans le cerveau est rapidement métabolisée par des ecto-enzymes qui permettent la conversion de l'ATP en adénosine diphosphate (ADP), en adénosine monophosphate (AMP) et en adénosine. Ces enzymes sont également appelées ecto-nucléotidases et il en existe, de différentes familles, dans tous les types cellulaires (Robson et al., 2006). Dans le cerveau, le principal type cellulaire impliqué dans la dégradation de l'ATP est la microglie qui exprime à la membrane l'ecto-nucléotidase CD39 (Braun et al., 2000). Cette enzyme convertit l'ATP en ADP puis en AMP, réduisant ainsi la quantité d'ATP extracellulaire. Des études ont montré que la délétion de l'ecto-nucléotidase CD39 chez la souris provoque une altération de la migration microgliale dans des modèles de lésions cérébrales et d'ischémies (Färber et al., 2008). L'expression de cette enzyme à la membrane des microglies est essentielle pour maintenir les concentrations extracellulaires d'ATP au plus bas ainsi qu'une activité de phagocytose des microglies en conditions basales à un bas niveau. Une étude a montré que l'ecto-nucléotidase est également impliquée dans l'attraction des prolongements des microglies vers l'ATP mais aussi dans la ramification des microglies. En effet, l'utilisation des souris invalidées pour l'enzyme CD39 présentent une diminution du nombre de prolongements microgliaux et ces derniers ne sont plus en mesure de répondre à une lésion induite par laser, dans des tranches aigües de cerveau (Matyash et al., 2017). Cependant, une étude plus récente a montré que le blocage de l'ATPase CD39 par son inhibiteur l'ARL-67156 n'affectait pas la ramification et la surveillance des microglies sur des tranches aigües de cerveau (Madry et al., 2018a).

Ainsi, l'ecto-ATPase présente à la membrane des microglies, CD39, est nécessaire pour la croissance orientée des prolongements microgliaux vers une lésion en hydrolysant l'ATP en ADP. Cependant, son rôle dans la surveillance et la ramification des microglies est encore controversé et nécessite plus d'investigations.

d) Récepteurs à l'adénosine

Les récepteurs à l'adénosine font partie de la famille des récepteurs purinergiques P1 et on distingue ainsi les récepteurs A1, A2A, A2B et A3. Des études *in vitro* ont permis de mettre en évidence l'expression de chacun de ces récepteurs dans les microglies (Abbracchio and Ceruti, 2007; Haskó et al., 2005). In vivo, les récepteurs A1 et A3 sont fortement exprimés dans le cerveau de souris adulte sain contrairement aux récepteurs A2A et A2B qui sont très faiblement exprimés (Koizumi et al., 2013). L'activation des microglies induite par un traitement au LPS ou dans un contexte pathologique induit une forte expression des récepteurs A2A par ces cellules, en parallèle d'une diminution de l'expression de P2Y12. La stimulation des récepteurs A2A par l'ATP induit la rétraction des prolongements microgliaux (Orr et al., 2009). Quant aux récepteurs A1 et A3, ils possèdent des fonctions inverses aux récepteurs A2A : l'activation du récepteur A1 induirait la migration microgliale alors que le récepteur A3 participerait à l'attraction des prolongements des microglies de concert avec le récepteur P2Y12 en réponse à l'ATP (Ohsawa et al., 2012).

3. Récepteurs aux neuromodulateurs

De nombreux récepteurs aux neuromodulateurs sont détectables sur les cellules microgliales et sont donc susceptibles de réguler certaines de leurs fonctions. Parmi eux, on retrouve la sérotonine, la dopamine, la noradrénaline, l'acétylcholine, et l'histamine. Je vais maintenant passer en revue les récepteurs aux neuromodulateurs qui sont exprimés par les microglies.

a) Récepteurs dopaminergiques

Comme d'autres neurones neuromodulateurs, les neurones dopaminergiques sont peu nombreux et bien regroupés dans des zones cérébrales spécifiques, principalement dans la substance noire et la zone tegmentale ventrale. Cependant, leurs axones se projettent dans de nombreuses régions du cerveau y compris les ganglions de la base, le cortex préfrontal, le noyau accumbens et l'amygdale. De plus, il existe une petite population de neurones dopaminergiques situés dans le noyau arqué de l'hypothalamus qui projettent vers l'hypophyse.

Les récepteurs à la dopamine sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) classés en deux grandes familles, activant soit les protéines Gas/olf (de type D1, récepteurs D1 et D5) soit les protéines Gai/o (de type D2, récepteurs D2, D3 et D4). La première preuve directe de la présence des récepteurs dopaminergiques (D1, D2, D4 et D5) dans les cellules microgliales chez le rongeur remonte à 2005 (Färber et al., 2005). Quelques années plus tard, il a été démontré un profil d'expression similaire mais pas identique (récepteurs D1 à D4 mais absence du récepteur D5) dans des cultures de microglies humaines âgées (Mastroeni et al., 2009) et pourrait dépendre de la région du cerveau. En effet, les récepteurs D1 et D2 ont été

observés dans les microglies CD11b positives isolées du noyau accumbens mais pas dans celles isolées de l'hippocampe (Schwarz et al., 2013). De plus, l'expression de ces récepteurs peut se faire selon le contexte et le degré d'activation de la microglie. En effet, l'utilisation de souris transgéniques exprimant l'EGFP sous le contrôle du promoteur *Drd2a* (gène codant pour le récepteur D2) montre que les microglies n'expriment pas le récepteur D2 dans au niveau du cortex chez la souris (Huck et al., 2015; Khlghatyan and Beaulieu, 2018) alors qu'il est exprimé dans les microglies activées via une ischémie cérébrale (Huck et al., 2015).

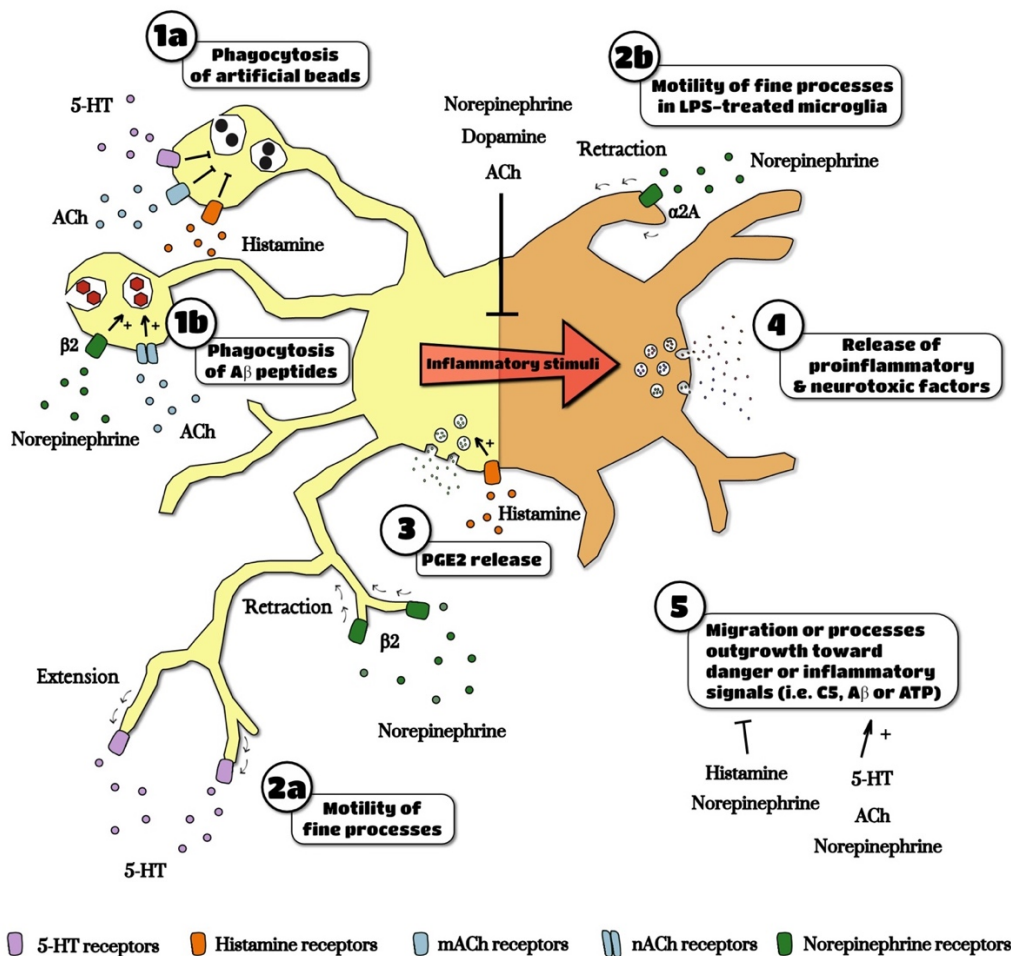


Figure 9: Régulation des fonctions microgliales par les neuromodulateurs. Effets de la sérotonine, l'histamine, l'acétylcholine et la norépinephrine sur les fonctions microgliales telles que la motilité, l'activité phagocytaire ou la libération de cytokines après activation microgliale (Pour revue Albertini et al, en révision).

b) Récepteurs à la norépinephrine

La norépinephrine est libérée par les projections des neurones noradrénergiques dont le soma est situé dans le locus cœruleus au niveau du tronc cérébral. Bien que chez le rongeur leur nombre ne dépasse pas 1500, les projections complexes des neurones noradrénergiques

permettent de libérer la norépinephrine dans l'ensemble du système nerveux central. Il existe deux classes de récepteurs à la noradrénaline : les récepteurs adrénergiques alpha (α 1-A, B, C et α 2-A, B, C) et bêta (β 1, β 2 et β 3). Dans les cultures primaires de microglies, il existe un consensus sur l'expression du sous-type du récepteur β 2, basé sur l'analyse de l'expression des ARNm (Mori et al., 2002; Tanaka et al., 2002) (Gyoneva and Traynelis, 2013; Ishii et al., 2015; Kong et al., 2010), et sur les approches pharmacologiques (Qian et al., 2011; Dello Russo et al., 2004). L'expression des récepteurs adrénergiques β 2 *in vivo* a été confirmée par des analyses transcriptomiques sur des microglies purifiées à partir de cerveau entier, ou de l'hippocampe et du cortex de souris (Matcovitch-Natan et al., 2016b; Zhang et al., 2014). L'expression du récepteur adrénergique β 1 est plus controversée mais a été vérifiée dans certaines études réalisées en culture (Mori et al., 2002; Tanaka et al., 2002) et *in vivo* (Hertz et al., 2010; Matcovitch-Natan et al., 2016b). D'autre part, comme pour de nombreux récepteur, l'expression des récepteurs adrénergiques peut dépendre de l'état d'activation des microglies. En effet, dans des cultures primaires de microglies, le traitement au lipopolysaccharide (LPS) diminue l'expression des récepteurs β 2 et régule positivement le récepteur α 2A (Gyoneva and Traynelis, 2013; Ishii et al., 2015) qui possède une affinité plus élevée pour la norépinephrine.

c) Récepteurs à l'acétylcholine

L'acétylcholine (ACh), en plus d'être un neurotransmetteur à action rapide au niveau de la jonction neuromusculaire, agit comme un neuromodulateur dans le SNC (Picciotto et al., 2012). La principale source d'ACh dans le SNC provient des projections des neurones présents au niveau des noyaux tegmentaux latéraux, dorsaux et l'habénula qui innervent de façon diffuse le SNC. L'ACh est également libérée localement par les interneurons cholinergiques dans le striatum et le noyau accumbens. Les récepteurs à l'acétylcholine sont classés en deux catégories principales : les récepteurs nicotiques (nAChR) qui sont des canaux cationiques ionotropes perméable aux ions Na^+ et K^+ et les RCPG muscariniques (mAChR) divisés en cinq sous-types de récepteurs. Les récepteurs M1, M3 et M5 sont couplés à la protéine Gq et les récepteurs M2 et M4 sont couplés à la protéine Gi/o. Le récepteur nicotinique α 7, un composant majeur de la voie anti-inflammatoire dans les macrophages (Wang et al., 2003) et présent dans les cultures de microglies de souris et de rat (Morioka et al., 2014; Shytle et al., 2004). L'expression des nAChR semble augmenter lors de conditions inflammatoires. En effet, dans un modèle animal de la maladie d'Alzheimer l'expression des nAChR α 7 augmente dans les microglies lorsqu'elles apparaissent au niveau des sites de lésion (Matsumura et al., 2015). De plus, des études immunohistochimiques ont révélé la surexpression des récepteurs nicotiques α 2 β 4 dans les microglies après une ischémie cérébrale (Martín et al., 2015). Concernant les récepteurs mAChR, peu d'informations sont présentes à ce sujet. Cependant, l'utilisation d'agonistes de ces récepteurs provoque une augmentation transitoire de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} dans les microglies au repos (Hirayama and Kuriyama, 2001; Zhang et al., 1998) et l'analyse par cytométrie en flux du cerveau adulte de souris a permis d'identifier une sous-population d'environ 15% de microglies M3 positives (Pannell et al., 2016).

d) Récepteurs à l'histamine

Dans le cerveau, l'histamine est libérée par les neurones des noyaux tubéromammillaires de l'hypothalamus ou peut être dégranulée par les mastocytes activés (de Haas et al., 2008). D'autre part, des cultures primaires de microglies peuvent exprimer l'histidine décarboxylase responsable de la production de l'histamine. Son niveau reste cependant faible en condition normale mais augmente après un traitement au LPS (Iida et al., 2015). De plus, seulement 5 à 10 % des microglies en culture ou fraîchement purifiées répondent à l'histamine par une augmentation de Ca^{2+} mais ce pourcentage augmente à 60 % dans les cellules traitées pendant 24 heures au LPS (Pannell et al., 2016). Il existe quatre récepteurs pour l'histamine, de H1 à H4, et sont tous couplés à des protéines G. Dans les cultures primaires, l'analyse de l'expression des ARNm ainsi que les approches pharmacologiques et fonctionnelles soutiennent l'expression des gènes *Hrh3* (Iida et al., 2015), *Hrh1* et *Hrh4* (Lenz and Nelson, 2018). Étonnamment, les analyses transcriptomiques sur microglies purifiées montrent une expression majoritairement du gène *Hrh2* (Zhang et al., 2014), en particulier dans les cellules microgliales corticales (Grabert et al., 2016).

e) Récepteurs à la sérotonine

Dans le cerveau, la sérotonine est synthétisée par les neurones sérotoninergiques présents dans les noyaux du raphé localisés dans le tronc cérébral. Grâce à la forte innervation du parenchyme cérébrale par les projections des neurones sérotoninergiques, la 5-HT est libérée dans toutes les régions du cerveau. Il existe quinze sous-types de récepteurs sérotoninergiques, divisés en plusieurs classes. Hormis le récepteur 5-HT₃ qui est un récepteur ionotropique, tous les autres récepteurs à la sérotonine sont des RCPG. Des études par transcriptase inverse et de PCR quantitative ont permis d'affirmer que le récepteur 5-HT_{2B} est le principal récepteur à la 5-HT exprimé dans les cultures primaires de microglies (Kolodziejczak et al., 2015; Krabbe et al., 2012). Ce récepteur est également exprimé dans les microglies fraîchement isolées à partir de cerveau de souris (Kolodziejczak et al., 2015).

De nombreux récepteurs sont présents à la membrane des microglies tels que les récepteurs aux cytokines, qui interviennent dans les processus de l'inflammation et de l'activation mais on retrouve également un grand nombre de récepteurs aux neuromodulateurs. Ces derniers peuvent agir sur les microglies à court terme en modulant leurs fonctions telles que leur motilité, la phagocytose ou à plus long terme en jouant sur leur état d'activation (**Figure 9**) (Albertini et al., en préparation).

IV. La motilité microgliale : une caractéristique clé pour les rôles des microglies

1. La surveillance microgliale

Dans le système nerveux central, en conditions physiologiques, les microglies possèdent un soma de petite taille et de longs et fins prolongements ramifiés. Grâce au développement de souris exprimant la protéine fluorescente GFP dans les microglies, et de techniques de chirurgie et de microscopie bi-photonique, il est possible, depuis une quinzaine d'années, d'observer la motilité des cellules microgliales dans le cerveau d'un animal vivant. Les premières études utilisant ces techniques ont permis d'observer la motilité des prolongements des microglies, et de montrer qu'ils sont constamment en mouvement via des phénomènes d'extensions et de rétraction (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). Les vitesses de croissance et diminution des prolongements sont d'environ 2 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). Cette motilité est une caractéristique primordiale pour permettre aux microglies de surveiller leur microenvironnement, de détecter des changements et d'exercer, en réponse, leurs différentes fonctions dans le parenchyme cérébral. Récemment, une étude menée par le laboratoire de Brian MacVicar a permis de faire la distinction entre deux types de surveillance microgliale : la surveillance à large échelle *via* les prolongements et la surveillance à échelle nanométrique *via* de fins filopodes situés à l'extrémité des prolongements (Bernier et al., 2019).

a) Surveillance à grande échelle via les prolongements

Chaque microglie possède son propre territoire qu'elle surveille, sans chevaucher celui des autres microglies (Jinno et al., 2007), grâce à ses prolongements constamment en extension et rétraction (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). Les facteurs et les mécanismes impliqués dans la surveillance microgliale commencent à être élucidés. En 2018, l'équipe de David Attwell a mis en évidence le rôle d'un canal ionique, le canal THIK-1, perméable au potassium, exprimé dans les microglies (Madry et al., 2018b). Ce canal permet de maintenir un potentiel de membrane V_m négatif. L'invalidation du canal THIK-1 chez la souris dépolarise la membrane des microglies provoquant ainsi une diminution de la ramification et donc de la surveillance microgliale. Ces résultats sont également observés en augmentant la concentration de potassium extracellulaire (Madry et al., 2018b). Le canal THIK-1 n'est pas présent dans les cultures de microglies ce qui pourrait expliquer les différences de morphologie entre les microglies ramifiées *in vivo* et amiboïdes en culture. D'autre part, l'expression du canal THIK-1 diminue avec l'âge, ce qui pourrait expliquer la diminution de la ramification des microglies au cours du vieillissement.

La mise en évidence du canal potassique THIK-1 dans la surveillance microgliale a permis de reconsidérer l'interprétation de résultats obtenus par le passé en utilisant une enzyme, l'apyrase, une hydrolase qui dégrade l'ATP en AMP et dont la forme commerciale est

généralement purifiée à partir de pomme de terre. L'ATP libérée par des lésions est connue pour attirer les prolongements des microglies (Davalos et al., 2005) mais des études ont également montré que l'ajout d'apyrase, sensée dégrader l'ATP et l'ADP, provoquait une diminution de la ramification des microglies ainsi qu'une diminution de la surveillance microgliale (Davalos et al., 2005; Kurpius et al., 2007). Ces résultats suggéraient qu'un certain niveau basal d'ATP extracellulaire permettait le maintien des ramifications et de la surveillance microgliale. Cependant, cette interprétation était en contradiction avec l'observation que le blocage de l'ecto-ATPase CD39, qui conduit à une augmentation du niveau d'ATP/ADP extracellulaire, n'affectait ni la ramification ni la surveillance des microglies. Des études récentes provenant du laboratoire de David Attwell ont démontré que les effets de l'apyrase sur la surveillance microgliale n'étaient pas dépendants de l'ATP/ADP extracellulaire mais des ions potassiques qui contaminent l'apyrase disponible dans le commerce. En effet, en mimant cette contamination par ajout d'ions K^+ ils ont pu observer une nette diminution de la ramification et de la surveillance microgliale. D'autre part, de l'apyrase préalablement dialysée afin d'enlever les ions potassiques n'a pas d'effet sur la surveillance microgliale (Madry et al., 2018a).

La ramification et surveillance microgliale sont également être modulées par le taux intracellulaire d'AMPC. En condition physiologique, ce taux est maintenu faible *via* l'activation basale ou constitutive de récepteurs couplés à des protéines $G_{\alpha i}$ tel que le récepteur Cx3cr1. En effet, l'invalidation de ce récepteur, ou la stimulation directe de l'adénylate cyclase, induisent, d'une part une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPC et d'autre part une diminution de la ramification et de la surveillance des microglies (Kalla et al., 2003; Liang et al., 2009; Pagani et al., 2015). Ainsi, le taux d'AMPC intracellulaire a un rôle non négligeable dans la maintenance de la ramification microgliale ainsi que dans la surveillance (**Figure 10**).

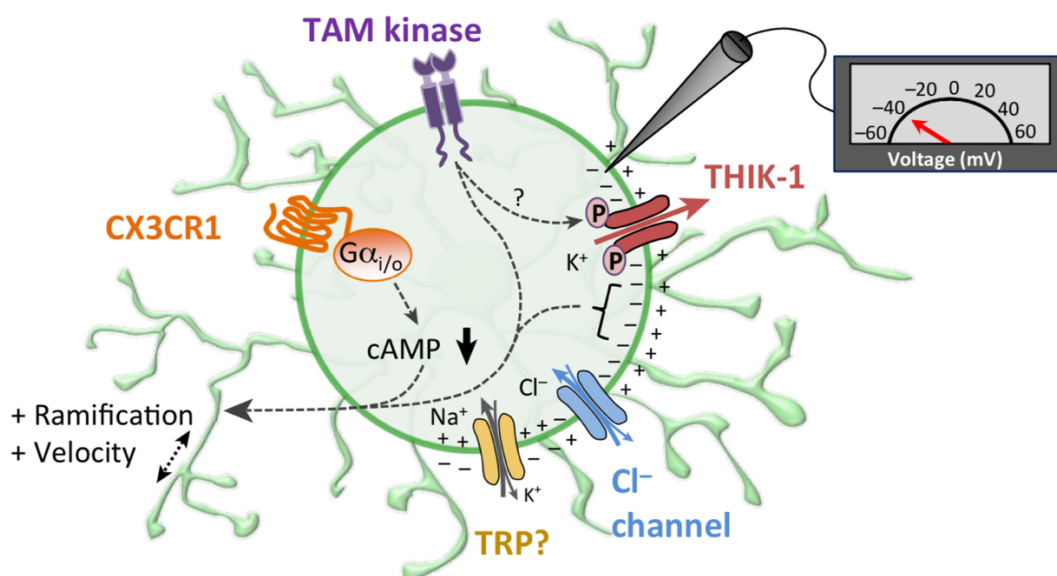


Figure 10: Schéma des récepteurs et canaux impliqués dans la surveillance microgliale à large échelle. Les microglies au repos possèdent un potentiel de membrane (V_m) négatif qui est maintenu par les canaux THIK-1, assurant la ramification et la surveillance des microglies (Pour revue (Izquierdo et al., 2019)).

Par ailleurs, les récepteurs tyrosine kinases favorisent la surveillance microgliale *in vitro* (Christiane-Nolte et al., 1997), tandis que la délétion microgliale spécifique des sous-types de tyrosine kinase TAM Mer et Axl diminue la surveillance microgliale *in vivo* (Fourgeaud et al., 2016). Les mécanismes d'action de ces récepteurs tyrosine kinases dans cette fonction sont encore peu étudiés mais ils peuvent toutefois affecter les canaux potassiques tels que THIK-1, qui est plus actif quand il est phosphorylé (Gierten et al., 2008) (pour revue (Izquierdo et al., 2019)).

b) Surveillance à échelle nanométrique via les filopodes

Depuis de nombreuses années, la morphologie et la motilité des microglies sont étudiées et leurs caractéristiques bien définies : une cellule hautement ramifiée avec de longs et fins prolongements émanant du soma et hautement motiles. Cependant, l'équipe de Brian MacVicar a récemment mis en évidence une morphologie plus complexe des microglies, avec la présence de filopodes aux extrémités des prolongements des microglies (Bernier et al., 2019).

Ces filopodes possèdent un diamètre plus petit et sont plus court que les prolongements et en conditions physiologiques, leurs mouvements permettant la surveillance sont plus rapides que ceux des prolongements qui les portent. Bien que le canal THIK-1 maintienne le niveau de ramification des prolongements des microglies (Madry et al., 2018b), il n'est pas impliqué dans la formation et la motilité des filopodes. Par ailleurs, dans plusieurs cellules, l'AMPc est un régulateur majeur de la motilité cellulaire et du réarrangement du cytosquelette (Howe, 2004). L'augmentation des concentrations intracellulaires d'AMPc, en bloquant sa dégradation, induit une rétraction rapide des prolongements des microglies mais une augmentation spectaculaire du nombre et de la longueur des filopodes. Ainsi, l'augmentation intracellulaire d'AMPc favorise l'extension des filopodes et leur distribution de surface au détriment des prolongements microgliaux qui se rétractent. Les variations des taux intracellulaires d'AMPc altèrent donc l'échelle de surveillance des microglies.

2. Extension et convergence des prolongements microgliaux vers une lésion

La surveillance microgliale, via les mouvements d'extension et de rétraction des prolongements microgliaux, permet aux microglies de détecter toutes perturbations de l'homéostasie tels que la mort cellulaire, l'entrée d'un pathogène, une inflammation ou encore une lésion tissulaire. Toutes ces perturbations entraînent ainsi une réponse rapide des microglies qui projettent leurs prolongements vers le site lésé. Ce phénomène est cependant régulé différemment de la surveillance microgliale, faisant intervenir des récepteurs et voies de signalisation propres, notamment *via* des récepteurs de type purinergique (Davalos et al., 2005; Haynes et al., 2006; Liang et al., 2009) (Avignone et al., 2015; Madry et al., 2018b).

En effet, l'ATP extracellulaire induit l'attraction des prolongements des microglies en activant le récepteur P2Y12, couplé à la protéine G α i, qui est principalement exprimé à la

membrane des microglies, plus particulièrement aux extrémités des prolongements. Ce phénomène a été découvert pour la première fois en culture (Honda 2001) puis *in situ* et *in vivo* (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005) (Kurpius et al., 2007; Wu et al., 2007). L'ATP est le principal nucléotide libéré par des lésions ou lors de la mort cellulaire et peut être aussi localement libéré par des cellules saines comme les astrocytes, ce qui peut conduire à une amplification du signal (Pascual et al., 2012). Cependant, le récepteur P2Y₁₂ possède également une plus forte affinité pour l'ADP, issue de l'hydrolyse de l'ATP par des ectonucléotidases présentes à la membrane des microglies telles que CD39 (pour revue (Madry and Attwell, 2015)), et l'ATP provoque de ce fait la même réponse que l'ADP. Des études *in vitro* ont permis de mettre en évidence les signalisations intracellulaires induites lors de ce mécanisme. En effet, l'activation du récepteur P2Y₁₂, par l'ATP ou l'ADP, bien qu'il soit couplé à la protéine G_{ai}, stimule la phospholipase C (PLC) et l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ induisant la phosphorylation d'Akt (Irino et al., 2008; Koizumi et al., 2007). D'autre part, l'application d'ADP sur des tranches aiguës de cerveau de souris induit une régulation à la hausse des intégrines β1 présentes notamment aux extrémités des prolongements microgliaux, dépendante de la PLC (Ohsawa et al., 2010). Les intégrines jouent un rôle important dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, permettant ainsi la croissance orientée des prolongements (**Figure 11**).

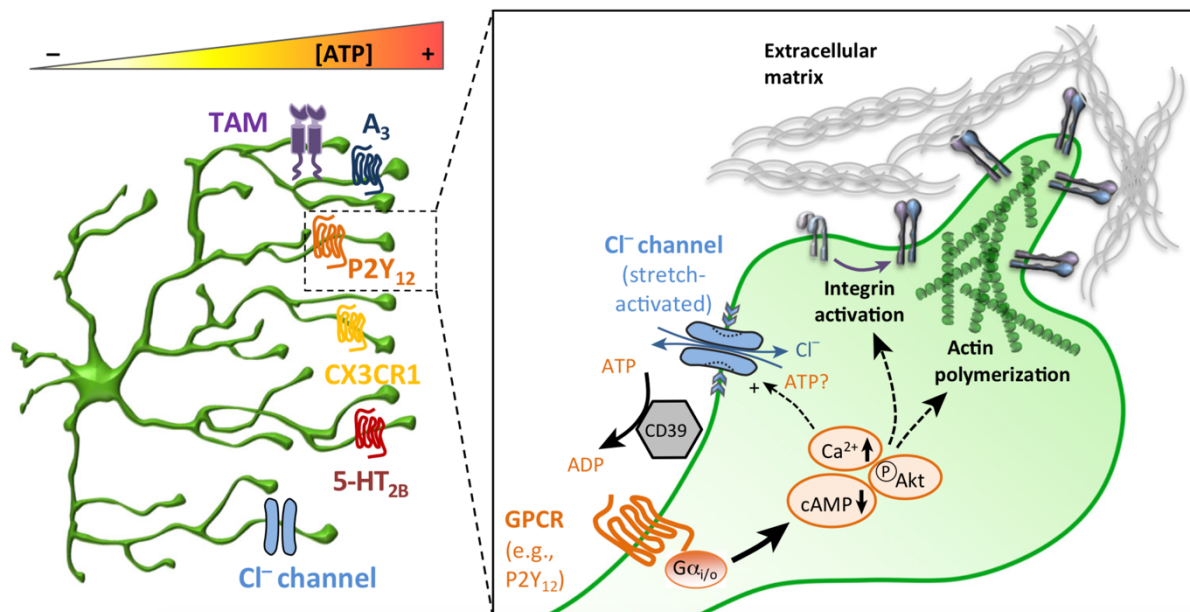


Figure 11: Récepteurs impliqués dans l'attraction des prolongements des microglies. Plusieurs récepteurs couplés aux protéines G sont impliqués dans l'attraction des prolongements microgliaux (gauche). L'attraction des prolongements microgliaux vers une forte concentration d'ATP est bien décrite dans la littérature et est dépendante du récepteur P2Y₁₂ (droite) (Pour revue (Izquierdo et al., 2019)).

Pour finir, les microglies sont capables d'étendre leurs prolongements vers une application locale sérotonine (5-HT) sur des tranches aiguës de cerveau de souris, et ce mécanisme est dépendant du récepteur 5-HT_{2B}, principal récepteur à la sérotonine exprimé par les microglies

(Kolodziejczak et al., 2015). Ce récepteur étant couplé à une protéine $G_{\alpha q}$, la signalisation intracellulaire impliquée dans la réponse à la sérotonine est encore inconnue, c'est donc la raison pour laquelle je me suis intéressée au rôle de la sérotonine sur la motilité des prolongements des microglies au cours de ma thèse. Les résultats sont présentés dans la deuxième partie des résultats de ce manuscrit.

3. Fonctions principales des cellules microgliales

Les cellules microgliales, via leurs prolongements hautement motiles, surveillent leur environnement leur permettant de réagir très rapidement lors de l'apparition de signaux inhabituels. La surveillance microgliale est une caractéristique clé dont plusieurs fonctions microgliales découlent (**Figure 12**).

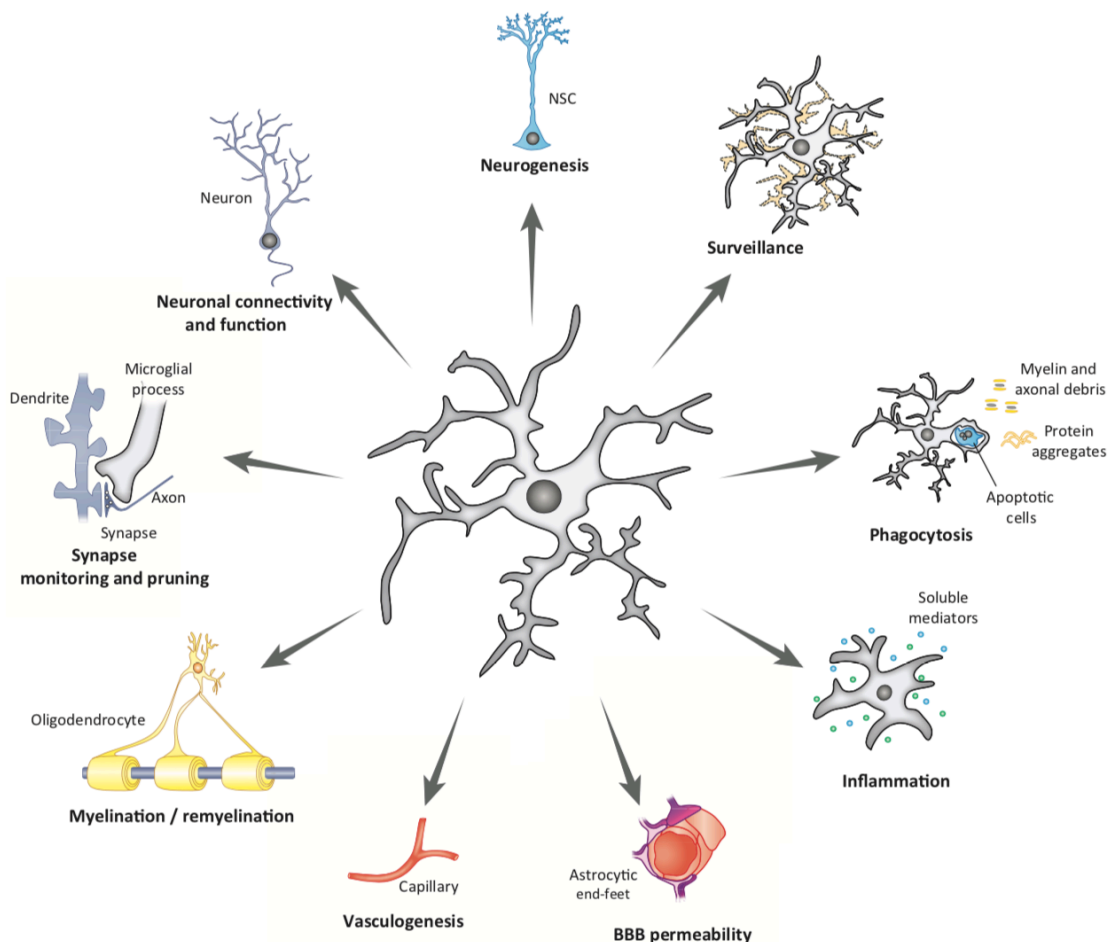


Figure 12: Les diverses fonctions des microglies en conditions physiologiques et pathologiques. La motilité microgliale est nécessaire la régulation de la neurogénèse, des interactions avec les neurones, de la libération de facteurs solubles et de la phagocytose (Illustration extraite de la revue (Sierra et al., 2019)).

a) Modulation de l'activité neuronale et des synapses

Grâce à leurs prolongements hautement motiles, les microglies sont capables de contacter les neurones qui les entourent (Li et al., 2012; Tremblay et al., 2010), et cela pourrait leur permettre de moduler l'activité des réseaux. En effet, une étude sur des larves de poisson-zèbre a montré que les microglies entraient préférentiellement en contact avec les neurones ayant une activité élevée et diminuaient leur activité (Li et al., 2012). Le développement de nouveaux outils génétiques permettant la déplétion des cellules microgliales chez la souris adulte ont également permis de confirmer le rôle des microglies dans la modulation de la densité des épines dendritiques. En effet, en 2013, Parkhurst et al., (Parkhurst et al., 2013) ont généré des souris transgéniques exprimant la Cre recombinase dans les microglies (sous le contrôle du promoteur *Cx3cr1*) et inductible par traitement au tamoxifène. Avec ces souris, ils ont pu exprimer le récepteur de la toxine diphtérique spécifiquement dans les microglies, et ainsi les dépléter par l'administration de cette toxine. La déplétion des cellules microgliales diminue le remodelage des épines dendritiques (touchant aussi bien la formation que l'élimination) en conditions basales mais également suite à une tâche d'apprentissage moteur (Parkhurst et al., 2013). D'autre part, chez des souris invalidées pour le gène microglial *Cx3cr1*, la densité des épines dendritiques des neurones hippocampiques (CA1) est augmentée à environ P15, par rapport à la densité observée chez les souris sauvages, et ce phénotype est associé à une diminution de la densité microgliale dans l'hippocampe (Paolicelli et al., 2011), à un défaut de maturation des microglies (Pagani et al., 2015) ainsi qu'à une accumulation de synapses immatures (Zhan et al., 2014). Ces résultats suggèrent un rôle de la microglie dans la maturation de la connectivité fonctionnelle cérébrale et un déficit en microglie pourrait contribuer à des altérations dans les réseaux neuronaux conduisant à des troubles neuro-développementaux.

b) Régulation de la neurogénèse adulte

La neurogénèse s'effectue en grande partie lors du développement embryonnaire et s'achève au cours de la période de l'adolescence. Cependant, la neurogénèse persiste à l'âge adulte au niveau de deux niches: la zone sous-ventriculaire, située sous la paroi des ventricules latéraux, et la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe (Taupin and Gage, 2002). Une partie seulement des précurseurs neuronaux produits dans ces niches neurogéniques survit et s'intègre ainsi dans les circuits existants (Gould et al., 1994). Les autres progéniteurs entrent en apoptose et sont phagocytés par les microglies dans un contexte non-inflammatoire (Sierra et al., 2010). En effet, à l'inverse de la phagocytose faite en conditions pathologiques, la phagocytose des précurseurs neuronaux se fait via des microglies ramifiées et non activées qui peuvent former des poches de phagocytose au niveau des extrémités de leurs prolongements. En parallèle de cette activité d'élimination des cellules apoptotiques, les microglies semblent favoriser activement la survie des progéniteurs. En effet, lorsque des souris adultes réalisent un effort physique, dans une roue d'exercice par exemple, et que par la suite, les neurones hippocampiques sont triés puis mis en culture, l'ajout de microglies à la culture augmente le nombre de progéniteurs neuronaux (détectés car ils induisent la formation de neurosphères),

particulièrement si les microglies viennent elles-mêmes de souris ayant réalisé l'exercice physique (Vukovic et al., 2012). Inversement, une altération des microglies par suppression du récepteur CX3CR1 chez la souris diminue la neurogénèse hippocampique à l'âge adulte ainsi que les capacités d'apprentissage (Rogers et al., 2011), et l'induction d'une neuroinflammation aiguë, donc d'une activation microgliale, par injection intrapéritonéale de LPS provoque une augmentation de l'apoptose des progéniteurs neuronaux (Sierra et al., 2010).

Les cellules microgliales participent donc à la neurogénèse à l'âge adulte en favorisant la survie des progéniteurs neuronaux mais aussi en éliminant les cellules immatures apoptotiques.

c) Phagocytose

La phagocytose est une fonction essentielle au maintien de l'homéostasie dans le SNC en permettant l'élimination des cellules apoptotiques, des pathogènes mais également des synapses surnuméraires et inappropriées, des morceaux de myéline ainsi que des agrégats dans certaines maladies neurodégénératives (Fu et al., 2014). Nous avons vu précédemment que les microglies, lors de la neurogénèse adulte, peuvent phagocyter les précurseurs neuronaux apoptotiques. De plus, comme tout macrophage, les microglies peuvent détecter des débris cellulaires ainsi que des pathogènes entraînant ainsi leur phagocytose. Cette dernière se fait en trois étapes faisant intervenir des signaux différents : « trouve-moi », « mange-moi » et « digère-moi » (Ravichandran, 2010).

Le premier signal « trouve-moi » implique des récepteurs microgliaux permettant aux microglies de reconnaître plusieurs types de ligands tels que le LPS à la membrane des bactéries (via les récepteurs Toll like) (Ribes et al., 2010), la phosphatidylsérine sur les cellules apoptotiques (via les récepteurs TAM kinases) (Dransfield et al., 2015) ou encore les plaques amyloïdes A β (via TREM2) (Zhao et al., 2018). Une fois que les microglies reconnaissent leurs ligands, le signal « mange-moi » est induit et va permettre le réarrangement du cytosquelette provoquant la formation d'une coupe phagocytaire. Celle-ci, en se refermant, va générer une vésicule intracellulaire qui, en fusionnant avec les lysosomes va former un phagolysosome, pouvant ainsi dégrader son contenu (« digère-moi »).

Ainsi, les microglies jouent un rôle important de phagocytes permettant d'éliminer les pathogènes externes ou encore les débris des cellules en apoptose en conditions pathologiques. De plus, les microglies sont capables de phagocytose en conditions physiologiques notamment au cours du développement en phagocytant les synapses immatures, qui sera expliqué ci-dessous. Des défauts de phagocytose microgliale auraient des conséquences importantes dans le SNC telles qu'une inflammation plus forte.

d) Libération de facteurs solubles

Dans le système immunitaire périphérique, on parle de polarisation des macrophages pour décrire la façon dont ces cellules vont réagir à leur environnement en adoptant une réponse de type anti-inflammatoire ou pro-inflammatoire. Nous avons vu précédemment que les microglies reçoivent de nombreux signaux permettant de maintenir ces cellules dans un état ramifié et quiescent ou activé (Kettenmann et al., 2011). Cependant, il existe un grand nombre d'états d'activation intermédiaires durant lesquels les microglies vont libérer différents types de facteurs solubles. Le terme de polarisation peut être appliqué aux microglies, de manière générale, ce qui nous permet de différencier les microglies de phénotype M1 dit « d'activation classique, pro-inflammatoire » des microglies de phénotype M2 dit « alternatif, anti-inflammatoire ».

En conditions pathologiques, les microglies vont répondre rapidement aux signaux libérés et adopter d'abord un phénotype M1 caractérisé par la libération de molécules et facteurs pro-inflammatoires. Ces différents facteurs tels que le monoxyde d'azote (NO), TNF α , IL-6 et IL-1 β (pour revue (Belarbi and Rosi, 2013)) vont amplifier la réponse inflammatoire permettant de combattre les pathogènes mais peuvent également avoir un effet néfaste sur les neurones avoisinants. En effet, par exemple, il a été montré *in vitro* et *in vivo* que les cytokines pro-inflammatoires TNF α et IL-1 β peuvent induire la mort neuronale via une voie dépendant de caspase 3 (McCoy and Tansey, 2008).

Il a également été montré que les microglies, dans un deuxième temps ou en réponse à des stimuli particuliers, changent d'état d'activation en adoptant un phénotype M2 dit « alternatif » qui correspond à une réponse anti-inflammatoire. Les microglies polarisées dans l'état M2 libèrent des facteurs et cytokines anti-inflammatoires telles qu'IL-4, IL-10, TGF β (transforming growth factor β) et le BDNF (brain derived neurotrophic factor) (Chhor et al., 2013). Ce phénotype M2 des microglies soutient la réparation et la reconstruction du parenchyme cérébral après les dommages causés (Czeh et al., 2011) et les facteurs libérés vont avoir un rôle de neuroprotection c'est-à-dire promouvoir la survie neuronale.

Pour finir, il est important de noter que les neuromodulateurs, tels que la sérotonine, sont capables de moduler les cellules microgliales en agissant sur différents facteurs comme par exemple la morphologie ou encore la régulation de l'expression des gènes de l'inflammation.

e) L'élagage synaptique (« pruning » synaptique)

Le remodelage synaptique est un processus important dans la maturation des circuits neuronaux. Au cours du développement du SNC, le nombre de connections synaptiques est beaucoup plus important que dans le cerveau mature (Rakic et al., 1986). Ainsi, grâce notamment aux fonctions de phagocytose des microglies, les synapses non fonctionnelles sont éliminées et seules les synapses appropriées sont conservées. La présence d'éléments

synaptiques phagocytés à l'intérieur ou très entourés par les cellules microgliales a été observé pour la première fois en microscopie électronique dans l'hippocampe en développement (Paolicelli et al., 2011). Les auteurs de cette étude ont également montré que la voie de la fractalkine/CX3CR1 joue un rôle dans le recrutement des microglies dans les régions où de l'élagage synaptique a lieu. La délétion du récepteur microglial CX3CR1 diminue transitoirement le nombre de microglies dans l'hippocampe, entre P8 et P28 et une élimination tardive des synapses immatures a été observée. Ainsi, la conséquence directe de ce défaut d'élagage synaptique est la persistance d'un excès de synapses immatures et donc la maturation des réseaux synaptiques est plus lente.

De plus, une autre étude a permis de comprendre certains mécanismes moléculaires permettant aux microglies de reconnaître et d'éliminer les synapses inappropriées. Ces travaux ont été réalisés dans le noyau géniculé latéral dorsal, une région faisant l'objet d'un intensif élagage synaptique des projections rétino-géniculées atteignant un pic à P5. Ils ont montré que chez la souris, lors du développement post-natal, les cellules microgliales sont capables d'éliminer sélectivement les éléments pré-synaptiques des projections rétino-géniculées ayant les plus faibles activités synaptiques (Schafer et al., 2012). De plus, les auteurs ont montré que ce mécanisme est médié par des protéines du complément. La délétion du récepteur microglial du complément, CR3, réduit en effet l'élagage synaptique, de même qu'un défaut d'expression des ligands neuronaux C1q ou C3 (Schafer et al., 2012).

Chapitre II : Le système sérotoninergique dans le système nerveux central

I. Généralités

1. Découverte de la sérotonine et localisation

La 5-hydroxytryptamine (5-HT), ou plus couramment connue sous le nom de sérotonine, a été isolée et caractérisée par Maurice Rapport en 1948 (Rapport et al., 1948), après avoir été identifiée dans le sérum comme une substance vasoconstrictrice et libérée par les plaquettes sanguines. Ce n'est qu'un an après que le nom de sérotonine est attribué à cette molécule (Rapport, 1949), d'après le mot Latin *serum* et le mot Grec *tonic*.

Des études montrent pour la première fois la présence de la 5-HT dans le système nerveux central (SNC) dans les années 1950 (Amin et al., 1954; Twarog and Page, 1953; Whitaker-Azmitia, 1999). La sérotonine joue un rôle de neuromédiateur dans le SNC et un rôle humoral en périphérie. Par ailleurs, la distribution de la sérotonine dans l'organisme est hétérogène puisque plus de 90% de sa production se fait en périphérie par les cellules entérochromaffines. La sérotonine ne passant pas la barrière hémato-encéphalique, la production des 10% restants est effectuée dans le SNC par d'autres cellules, les neurones sérotoninergiques du raphé.

2. Métabolisme de la sérotonine

La sérotonine est synthétisée dans deux types cellulaires différents : dans le SNC elle est synthétisée dans les neurones sérotoninergiques, alors que sa synthèse se fait dans les cellules entérochromaffines du tractus gastro-intestinal en périphérie. Dans ces deux cas, la sérotonine est issue de la conversion de l'acide aminé essentiel L-Tryptophane en 5-hydroxytryptophane (5-HTP) par l'enzyme tryptophane hydroxylase (TPH). Chez les mammifères, il existe deux gènes codant pour deux isoformes de cette enzyme. La TPH1 est localisée en périphérie (peau et intestin) tandis que la TPH2 est localisée dans le SNC dans les neurones sérotoninergiques (Walther and Bader, 2003). Le 5-HTP subit ensuite une décarboxylation, par la décarboxylase des acides aminés (AADC), afin d'obtenir la 5-HT. La sérotonine (5-HT) est ensuite stockée dans les vésicules synaptiques par le transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT) (Kanner and Schuldiner, 1987).

Après sa libération par exocytose, la 5-HT se lie à ses récepteurs présents à la membrane des neurones post-synaptiques ou sur d'autres types cellulaires. Les concentrations extracellulaires de sérotonine sont finement régulées par recapture de la sérotonine. Celle-ci est faite grâce au transporteur membranaire de la sérotonine (Sérotonin Transporteur, SERT) permettant ainsi soit le recyclage de la 5-HT dans les vésicules synaptiques, via VMAT, ou alors sa dégradation par les monoamines oxydases (MAO), situées sur la membrane externe des mitochondries. Les MAO effectuent une désamination oxydative de la 5-HT en 5-hydroxyindole acétaldéhyde (5-HIAA) (**Figure 13**).

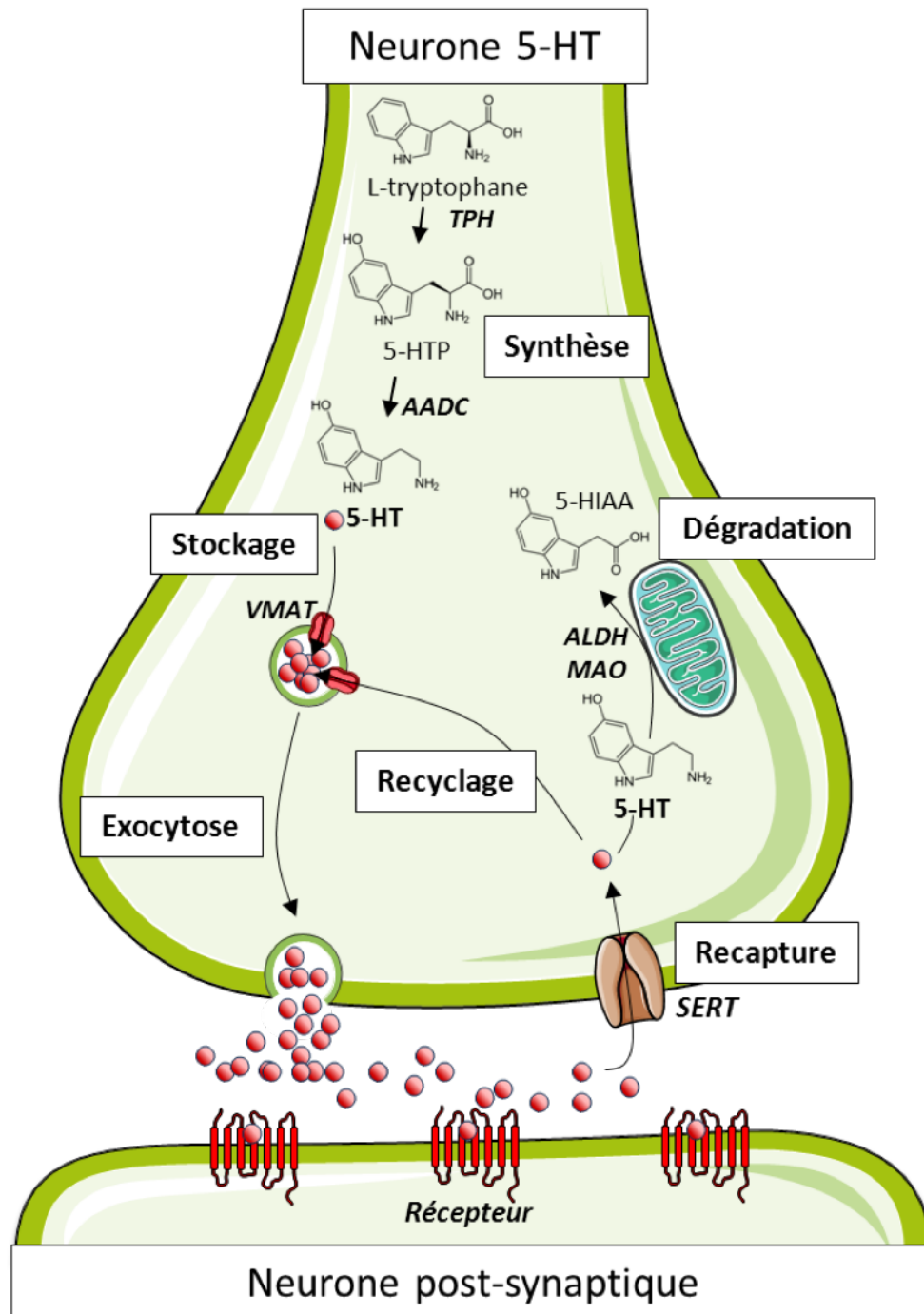


Figure 13 : Métabolisme de la sérotonine dans le SNC. La sérotonine, après avoir été synthétisée à partir du tryptophane, est stockée dans les vésicules synaptiques. Une fois libérée par exocytose, la 5-HT se lie à ses récepteurs mais peut également être recaptée pour être soit recyclée dans les vésicules synaptiques, soit dégradée par les mitochondries (Illustration d'Arnaud Belmer).

3. Distribution des neurones sérotoninergiques

Les neurones sérotoninergiques dans le SNC possèdent une organisation complexe. En effet, des études par immunohistochimie et autoradiographie ont mis en évidence la présence de neuf noyaux sérotoninergiques (B1 à B9) dans le tronc cérébral (Dahlström and Fuxe, 1964), contenant les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques. Ces neurones ont la particularité

d'envoyer leurs projections dans tout le parenchyme cérébral afin d'y libérer la 5-HT (**Figure 14**). Cette innervation dense du parenchyme par les neurones sérotoninergiques permet à la 5-HT d'être impliquée dans de nombreux processus physiologiques et cognitifs tels que les émotions (citation), la régulation des cycles circadiens (Prosser et al., 1990), les cycles veille / sommeil (Portas et al., 2000; Ursin, 2002), la locomotion (Jacobs and Fornal, 1993; White et al., 1996), les comportements sexuels, alimentaires ou sociaux (Weiger, 1997).

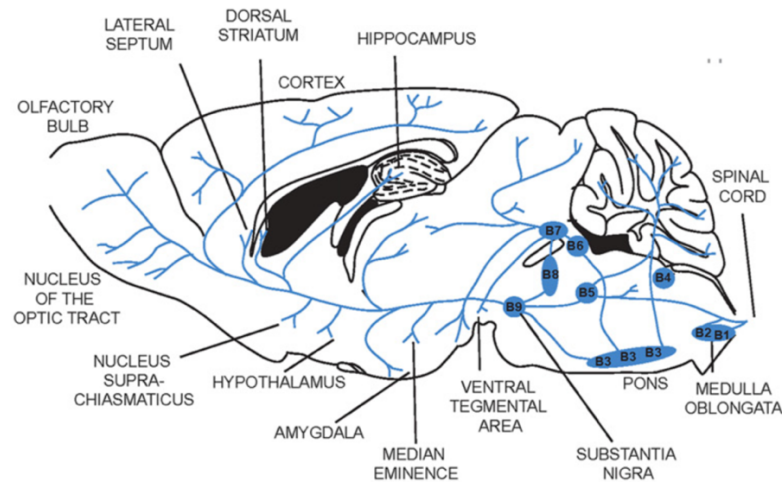


Figure 14: Distribution des neurones sérotoninergiques. Les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques sont regroupés en 9 noyaux (B1 à B9) situés dans le raphé. Ces neurones ont la particularité d'envoyer leurs projections dans tout le parenchyme cérébral afin d'innervier un grand nombre de régions cérébrales (Voisin et al., 2016).

Chez la souris, la neurogénèse des précurseurs des neurones sérotoninergiques se fait lors de la période prénatale entre E9 et E11 en donnant naissance, en premier lieu, aux précurseurs des neurones du raphé dorsal, DR (noyaux B7-B8), puis aux précurseurs neuronaux du raphé médian, RM (noyaux B5-B8-B9) et enfin aux précurseurs neuronaux du raphé caudal (B1-B3) (Cordes, 2005; Jensen et al., 2008). Dès le douzième jour de la période embryonnaire E12, les neurones sérotoninergiques produisent de la 5-HT et commencent à envoyer leurs projections vers le cortex à E14. Ce n'est que 21 jours après la naissance que les réseaux des neurones sérotoninergiques sont matures chez la souris (Gaspar et al., 2003).

Les neurones sérotoninergiques possèdent différents marqueurs moléculaires, membranaires et intracellulaires. Les marqueurs les plus utilisés sont la TPH2, l'AADC, le transporteur de la sérotonine (SERT) et le VMAT2. La différenciation des neurones précurseurs en neurones sérotoninergiques exprimant ces marqueurs est dépendante de l'expression du facteur de transcription Pet-1 (Liu et al., 2010; Wyler et al., 2016). C'est pourquoi le laboratoire utilise des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur Pet-1 pour invalider ou faire exprimer des gènes spécifiquement dans les neurones sérotoninergiques.

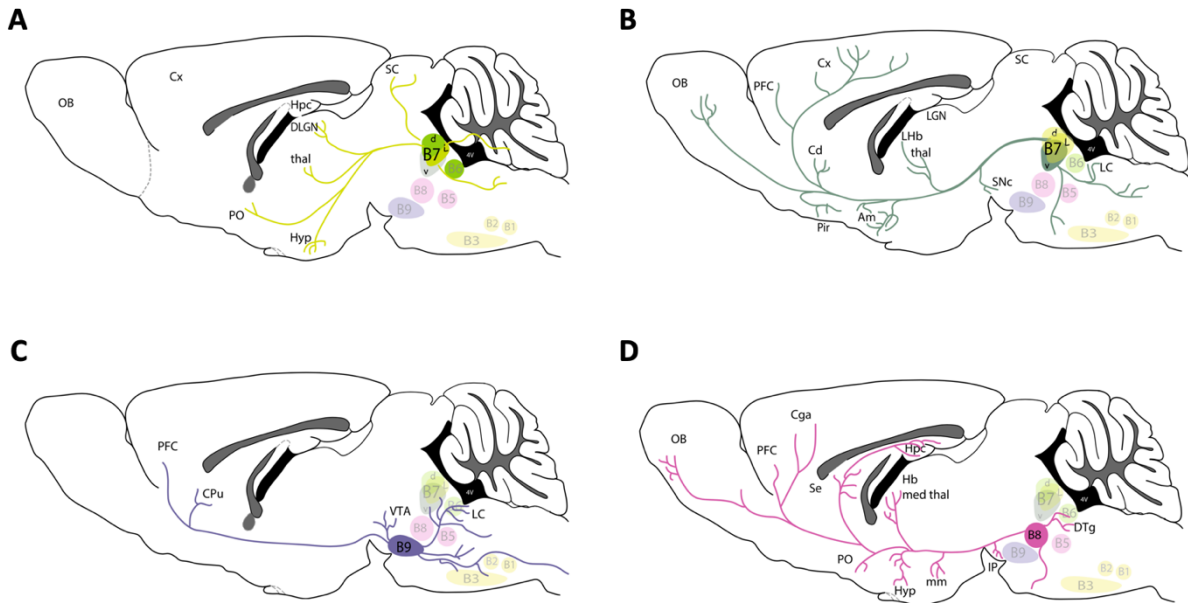


Figure 15: Projections des neurones sérotoninergiques en fonction des noyaux du raphé. Projections des neurones sérotoninergiques issus des noyaux B7 (A-B), B9 (C) et B8 (D) dans le SNC de la souris. On observe que toutes les régions du cerveau sont innervées par les axones des neurones sérotoninergiques provenant des noyaux B7, B8 et B9 du raphé (Muzerelle et al., 2016).

Les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques des noyaux B1, B2 et B3 sont les plus caudaux et projettent majoritairement dans la moelle épinière tandis que ceux présents dans les noyaux du raphé dorsal (DRN) B6-B7 et du raphé médian (DRM) B5-B8-B9 projettent dans tout le parenchyme cérébral (**Figure 14**). D'autre part, le noyau B7 dorso-latéral projette dans les structures centrales telles que le thalamus, l'hippocampe et le corps géniculé latéral (dLGN) (**Figure 15A**) tandis que le noyau B7 ventral projette plutôt vers les structures corticales (**Figure 15B**). D'autre part, le noyau B8 innerve aussi bien les structures centrales (hippocampe, thalamus) que les structures corticales (bulbe olfactif, cortex préfrontal) (**Figure 15D**). Pour finir, le noyau B9 innerve le cortex préfrontal, l'aire tegmentale ventrale (VTA) et le locus coeruleus (**Figure 15C**).

II. Les récepteurs sérotoninergiques

L'activation des neurones sérotoninergiques provoque l'exocytose des vésicules contenant la sérotonine dans la fente synaptique permettant ainsi sa liaison aux récepteurs présents sur le neurone post-synaptique. Cependant, la sérotonine peut également être libérée en dehors des fentes synaptiques à partir des varicosités présentes le long des neurones sérotoninergiques. De là, la sérotonine peut diffuser sur plusieurs micromètres et activer des récepteurs distants par un mécanisme appelé « transmission de volume » (Bunin and Wightman, 1998; Umbriaco et al., 1995; Zoli et al., 1999). Cette libération de sérotonine par transmission de volume permettrait de diffuser dans le milieu extracellulaire afin d'être détectée par les cellules microgliales, qui sont capables d'étendre leurs prolongements vers une source de sérotonine et d'avoir une

grande proximité avec les varicosités axonales (Kolodziejczak et al., 2015). La sérotonine peut se lier à différents types de récepteurs sérotoninergiques qui diffèrent par leur couplage intracellulaire et leur distribution dans le cerveau.

1. Classification et couplage intracellulaire

Les récepteurs sérotoninergiques sont classifiés selon leurs propriétés pharmacologiques et leurs structures (Choi and Maroteaux, 1996; Peroutka, 1995). On recense actuellement chez les mammifères sept familles de récepteurs sérotoninergiques (récepteurs 5-HT1 à 5-HT7), regroupant 14 gènes différents. A l'exception des récepteurs canaux 5-HT3, les récepteurs sérotoninergiques sont des récepteurs métabotropiques appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ces récepteurs partagent une structure commune composée de sept domaines transmembranaires, un domaine extracellulaire et un domaine intracellulaire. Ils sont chacun couplés à une protéine G qui est activée après fixation d'un ligand sur son récepteur. Les protéines G sont composées de trois sous-unités (α , β et γ) et après activation du récepteur, les sous-unités α et $\beta\gamma$ se séparent afin d'agir sur leurs effecteurs respectifs. Il est donc possible de classer les récepteurs sérotoninergiques en trois sous-groupes selon leur couplage intracellulaire (**Figure 16**) :

- (1) les récepteurs 5-HT1/5 couplés à la protéine $G_{\alpha i}$,
- (2) les récepteurs 5-HT2 couplés à la protéine $G_{\alpha q}$
- (3) les récepteurs 5-HT4/6/7 couplés à la protéine G_s

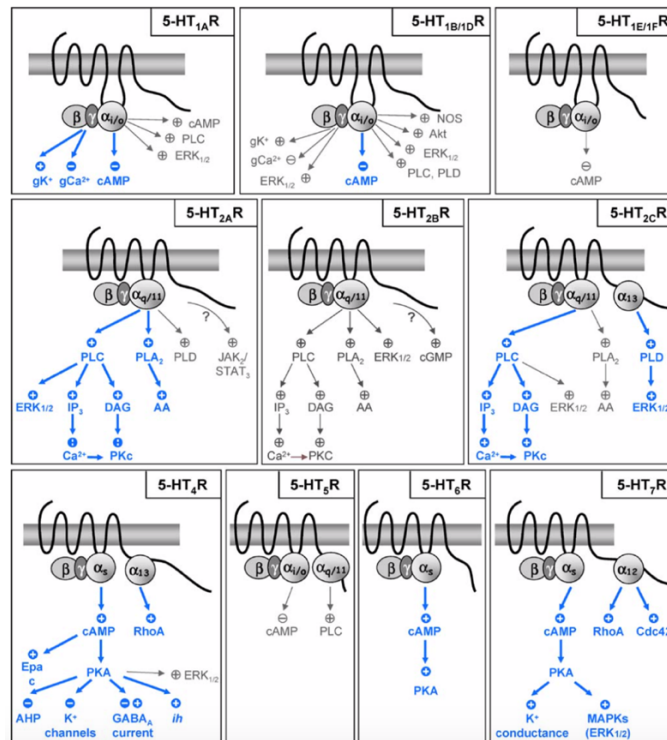


Figure 16: Couplage et voies de signalisation des récepteurs sérotoninergiques métabotropiques. Bleu : signalisation induite dans les neurones sérotoninergiques, noir : signalisation induite dans les cellules transfectées uniquement (Bockeaert et al., 2006).

Les récepteurs 5-HT₁ et 5-HT₅ sont couplés négativement à une protéine G_{ai/o} et leur activation induit une inhibition de l'adénylate cyclase (AC) provoquant une diminution de la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) à partir d'ATP. L'activation de ces récepteurs entraînent une augmentation des courants potassiques sortants et une diminution des courants calciques entrants, dans les neurones et les cellules qui expriment les canaux adéquats (**Figure 17A**).

Les récepteurs de la famille 5-HT₂ sont quant à eux positivement couplés à une protéine G_{αq/11} et leur activation induit la voie de la phospholipase C (PLC) provoquant l'hydrolyse du phosphatidylinositol biphosphate (PIP₂) en inositol triphosphate (IP₃) et en diacylglycérol (DAG) (Conn and Sanders-Bush, 1984). L'IP₃, étant un second messenger de cette voie de signalisation, induit la libération des stocks intracellulaires de Ca²⁺ tandis que le DAG active la protéine kinase C (PKC) permettant la phosphorylation d'ERK (**Figure 17B**).

Pour finir, les récepteurs des familles 5-HT_{4/6/7} sont couplés à une protéine G_s qui, contrairement à la voie de signalisation couplée à la protéine G_{ai/o}, activent l'AC et fait augmenter la concentration intracellulaire d'AMPc à partir d'ATP. Cette voie de signalisation permet également d'activer la protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle alors des protéines cibles (**Figure 17C**).

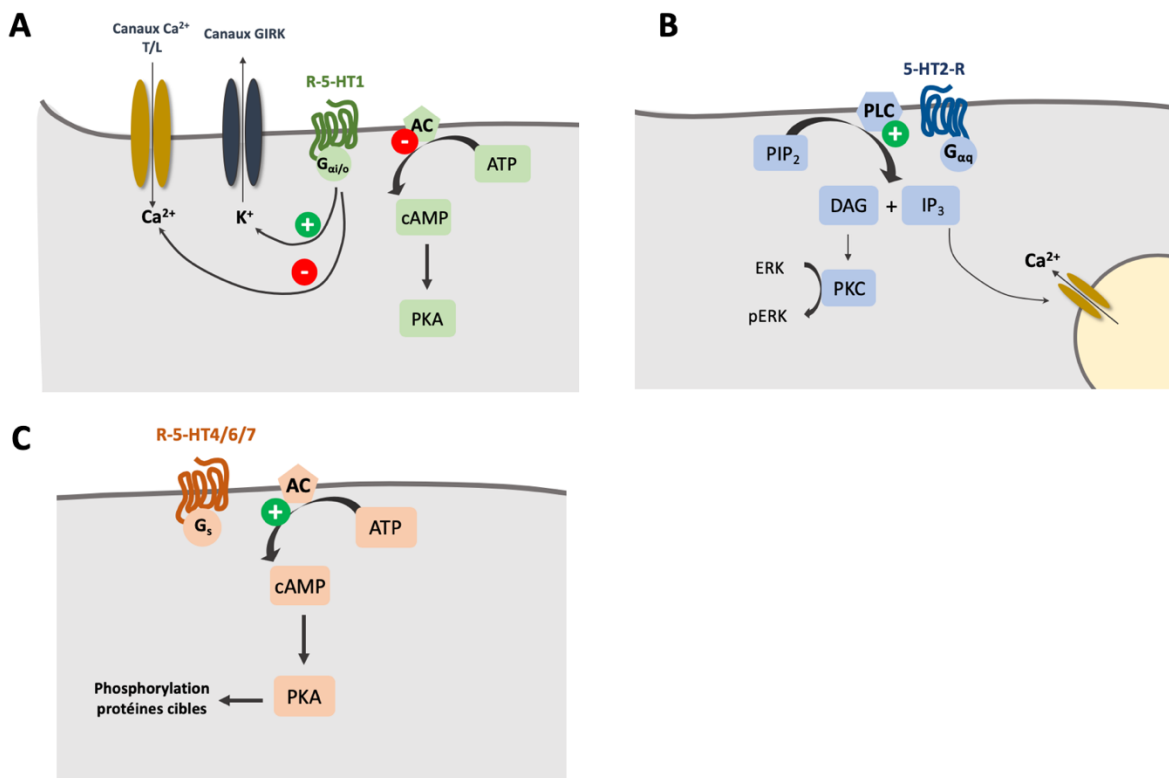


Figure 17 : Voie de signalisation détaillée pour les récepteurs sérotoninergiques métabotropiques. Couplage des récepteurs 5-HT₁ à une protéine G_{ai} (A). Couplages des récepteurs 5-HT₂ à la protéine G_{αq}. Couplage des récepteurs 5-HT_{4/6/7} à la protéine G_s (C).

Durant ma thèse, je me suis particulièrement intéressée à l'un des récepteurs de la sérotonine de type 2, le récepteur 5-HT_{2B} que je décrirai plus en détail dans le chapitre 3.

2. Oligomérisation

Au cours des dernières années, plusieurs études ont montré l'existence d'oligomères physiologiquement actifs de RCPG (Bouvier, 2001; Gaitonde and Gonzá Lez-Maeso, 2017). Ces oligomères sont représentés en deux catégories : les homodimères lorsque les récepteurs sont identiques et les hétérodimères lorsque les récepteurs sont de types différents et cette dimérisation peut affecter les voies de signalisation du ou des récepteurs impliqués (Pour revue (Borroto-Escuela et al., 2017)). On retrouve ce processus d'oligomérisation pour certains récepteurs sérotoninergiques qui peuvent former des homodimères et/ou des hétérodimères avec d'autres récepteurs sérotoninergiques ou d'autres systèmes de neurotransmission (Pour revue (Maroteaux et al., 2019)).

a) Homodimères

L'homodimérisation des récepteurs sérotoninergiques a été mise en évidence pour la première fois pour les récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT_{1D} *in vitro* (Halazy 1996, Xie 1999). Peu de temps après, différentes études ont démontré l'existence d'homodimères fonctionnels pour les récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₄ et 5-HT₇ (Pour revue (Maroteaux et al., 2019)). Cependant, malgré une structure similaire par rapport aux récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C}, le récepteur 5-HT_{2B} ne forme pas d'homodimères dans les cellules COS-7 (Moutkine et al., 2017).

b) Hétérodimères

Les récepteurs **5-HT_{1A}**, couplés à une protéine G_{ai}, sont capables de former des hétérodimères aussi bien *in vitro* que *in vivo* avec les récepteurs **5-HT₇**, étant eux couplés avec une protéine G_s (Renner et al., 2012). Exprimé seul, l'activation du récepteur 5-HT_{1A} induit l'ouverture des canaux potassiques rectifiants activés par les protéines G (GIRK). Cependant, dans les lignées cellulaires et les neurones hippocampiques, l'hétérodimérisation des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₇ diminue le couplage du récepteur 5-HT_{1A} avec la protéine l'hétérodimérisation diminue le couplage du récepteur 5-HT_{1A} avec la protéine G_{ai} diminuant ainsi l'activité des canaux GIRK (Renner et al., 2012). Ainsi, l'hétérodimérisation peut affecter quantitativement le couplage des récepteurs impliqués.

Les récepteurs 5-HT_{1A} forment également des hétérodimères avec des récepteurs non sérotoninergiques tels que les récepteurs **μ-opiïdes** (Cussac et al., 2012), les récepteurs à

l'adénosine **A2A** (Łukasiewicz et al., 2007), les récepteurs **GABAB** (Salim et al., 2002) et les récepteurs dopaminergiques **D2** (Szlachta et al., 2018).

Les récepteurs **5-HT2A** s'hétérodimérisent avec plusieurs récepteurs non sérotoninergiques tels que les récepteurs glutamatergiques **mGluR2**, les récepteurs dopaminergiques **D2** et les récepteurs cannabinoïdes **1 CB1**.

L'association du récepteur **5-HT2A** (couplage $G_{\alpha q}$) avec le récepteur **mGluR2** (couplage $G_{\alpha i}$) a été démontrée dans des cellules HEK293 co-transfectées ainsi que *in vivo* dans des neurones corticaux (González-Maeso et al., 2008; Moreno et al., 2012). Ce complexe hétérodimérique a été principalement étudié dans la signalisation induite par les antipsychotiques. En effet, chez les souris dépourvues du récepteur **mGluR2** ou **5-HT2A**, les effets psychoactifs induits par le DOI sont abolis. Ces effets sont donc dépendants de la dimérisation des récepteurs **5-HT2A** et **mGluR2** (Moreno et al., 2012). De plus, le composé hallucinogène (LY341495, agoniste inverse des **mGluR2**) change l'équilibre des voies de signalisation de l'hétérodimère en diminuant fortement son couplage à $G_{\alpha i}$ (du récepteur **mGluR2**) en faveur du couplage $G_{\alpha q}$ (du récepteur **5-HT2A**). Des effets opposés sont observés avec l'utilisation d'antipsychotiques (LY379268, agoniste du récepteur **GluR2** et la clozapine, agoniste inverse du récepteur **5-HT2A**). D'ailleurs, ces antipsychotiques n'ont plus d'effets chez des souris invalidées pour le gène de l'un ou de l'autre de ces deux récepteurs, démontrant ainsi la pertinence fonctionnelle de cet hétérodimère *in vivo* (Fribourg et al., 2011).

Les récepteurs **5-HT2A**, couplés à la protéine $G_{\alpha q}$ (quand sont à l'état monomérique) forment des dimères avec les récepteurs dopaminergiques **D2** (couplés $G_{\alpha i}$ quand sont à l'état monomérique) (Albizu et al., 2011; Łukasiewicz et al., 2011). La dimérisation augmente l'affinité des récepteurs **5-HT2A** pour leur agoniste DOI mais fait diminuer leur couplage à la PLC (Albizu et al., 2011). L'hétérodimère **5-HT2A-D2** est un exemple de régulations croisées asymétriques et dépendantes du ligand. En effet, on observe une transactivation du récepteur **5-HT2A** par les agonistes du récepteur **D2** et une trans-inhibition des récepteurs **D2** par une partie des agonistes des récepteurs **5-HT2A**.

Les récepteurs cannabinoïdes **CB1** (couplés $G_{\alpha i}$) et les récepteurs **5-HT2A** sont tous les deux exprimés dans des régions cérébrales spécifiques impliquées dans l'émotion et la mémoire, et il a été démontré que les effets amnésiques et anxiolytiques de l'agoniste du récepteur **CB1**, le delta9-tétrahydrocannabinol (THC) nécessitent la présence du récepteur **5-HT2A**, sous-tendant l'existence d'hétérodimères de ces deux récepteurs. Leur existence a été observée aussi bien en culture que *in vivo* (Pour revue (Maroteaux et al., 2019)).

III. Rôle de la sérotonine sur le système immunitaire

Des études ont mis en évidence le rôle de la sérotonine sur le système immunitaire. En périphérie, la sérotonine agit sur le système cardiovasculaire et gastro-intestinal et dans le SNC, la 5-HT est un neurotransmetteur agissant sur diverses fonctions telles que l'humeur, le comportement, le sommeil ou encore l'appétit.

1. Système immunitaire périphérique

En périphérie, de nombreuses cellules sont requises pour lutter contre l'entrée de pathogènes, infection ou inflammation. Parmi ces cellules on retrouve les monocytes, les cellules dendritiques, les éosinophiles, les mastocytes ainsi que les macrophages. L'expression de certains récepteurs sérotoninergiques ainsi que du transporteur à la sérotonine (SERT) par les cellules immunitaires situées en périphérie. Ainsi, la 5-HT est capable de jouer un rôle dans la polarisation des macrophages. En outre, la 5-HT, via les récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT₇ tous deux exprimés par les macrophages, favorise leur polarisation vers un phénotype M2 en augmentant l'expression des gènes anti-inflammatoires et en diminuant l'expression des gènes pro-inflammatoire (de las Casas-Engel et al., 2013).

2. Système immunitaire du SNC

Contrairement au système immunitaire périphérique, le rôle de la sérotonine sur les cellules immunitaires présentes dans le cerveau est encore peu connu. Cependant, des études récentes au laboratoire et ailleurs ont montré par RT-PCR que le récepteur 5-HT_{2B} est le principal récepteur à la sérotonine exprimé dans des cultures primaires de microglies (Kolodziejczak et al., 2015; Krabbe et al., 2012) et que l'activation de ce récepteur par un agoniste provoque un signal calcique (Krabbe et al., 2012). D'autre part, ce récepteur, ainsi que d'autres sous-types de récepteurs sérotoninergiques, sont également détectés dans des microglies fraîchement isolées à partir de cerveau de souris (Kolodziejczak et al., 2015; Krabbe et al., 2012), confirmant son expression microgliale *in vivo*.

La mise en évidence de l'expression de certains récepteurs sérotoninergiques par les cellules microgliales amène à penser que la sérotonine pourrait réguler certaines de leurs fonctions. Le laboratoire a montré qu'une application locale de 5-HT sur des tranches aiguës de cerveau de souris induit une attraction des prolongements des microglies vers cette application, dépendante du récepteur 5-HT_{2B} (Etienne et al., 2019; Kolodziejczak et al., 2015).

En plus de ses effets sur la morphologie et la motilité des prolongements des microglies, la 5-HT agit également sur la modulation de la neuroinflammation. En effet, il a été montré que de fortes concentrations de 5-HT ou d'agonistes des récepteurs 5-HT₂ inhibent la phagocytose par les cellules microgliales (Krabbe et al., 2012). D'autre part, il a été montré que la 5-HT est capable de moduler l'expression de certaines cytokines et de leurs récepteurs. En effet, le laboratoire a montré que l'inactivation du récepteur 5-HT_{2B} dans des cultures primaires de microglies induit une surexpression de certaines cytokines et de leurs récepteurs (Kolodziejczak et al., 2015). De récents résultats du laboratoire non publiés ont également montré que la délétion de ce récepteur spécifiquement dans les microglies augmente et prolonge le comportement de maladie chez la souris après induction d'une inflammation périphérique par du lipopolysaccharide (LPS). Par ailleurs, cette délétion entraîne une augmentation de l'expression de certaines cytokines dans le SNC uniquement, après une inflammation

périphérique au LPS. Ainsi, la modulation de l'expression des gènes de l'inflammation par le récepteur 5-HT_{2B} à la suite d'une inflammation périphérique au LPS sous-tend un effet polarisant de la 5-HT sur les microglies. Ces résultats ont fait l'objet d'un article soumis au journal *Biological Psychiatry*, dont je suis co-auteur, et présentée en Annexe.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la modulation de la morphologie des cellules microgliales, et plus particulièrement sur la motilité de leurs prolongements, par la sérotonine via le récepteur 5-HT_{2B}, principal récepteur à la sérotonine exprimé par les microglies (Kolodziejczak et al., 2015).

Chapitre III : Le récepteur 5-HT_{2B}

I. Généralités

1. Structure du récepteur

Le récepteur 5-HT2B a été cloné pour la première fois à partir d'ADN de souris en 1992 (Choi and Maroteaux, 1996; Loric et al., 1992) puis de rat en 1993 (Wainscott et al., 1993) et enfin à partir d'ADN humain (Kursar et al., 1994; Schmuck et al., 1994; Wainscott et al., 1996).

Chez l'humain, le gène codant pour le récepteur 5-HT2B, dont la taille fait 16,8 kb, est localisé sur le chromosome 2 dans le locus 2q.36.3-37.1 (Horton et al., 1996). Chez la souris, le gène codant ce récepteur est légèrement plus petit, d'une taille de 12,9 kb, et est localisé sur le chromosome 1. Aussi bien chez l'Homme, le rat et la souris, ce gène contient quatre exons, dont un non codant, et trois introns. Chez la souris, il code pour une protéine de 479 acides aminés pour un poids moléculaire de 53,6 kDa (Colas et al., 1997; Horton et al., 1996), alors que la protéine possède deux acides aminés de plus chez l'Homme pour un poids moléculaire de 54,2 kDa.

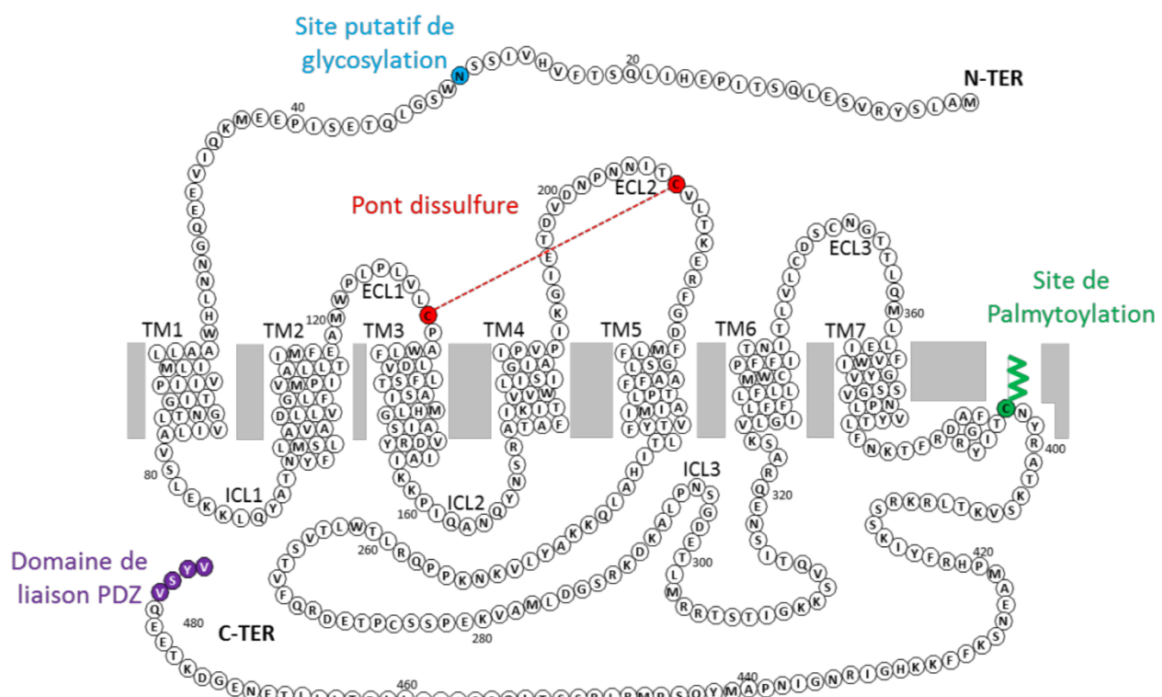


Figure 18 : Topologie du récepteur 5-HT2B humain. TM : domaine transmembranaire, ECL : boucle extracellulaire et ICL : boucle intracellulaire (Illustration réalisée par Arnaud Belmer).

Comme tout récepteur couplé aux protéines G (RCPG), le récepteur 5-HT2B possède sept domaines transmembranaires hydrophobes, reliés par trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires, ainsi qu'une partie N-terminale extracellulaire et une partie C-terminale intracellulaire. Ce récepteur possède également un site putatif de glycosylation, un pont disulfure, un site de palmitoylation ainsi qu'une séquence de liaison aux domaines PDZ (**Figure 18**) (Manivet et al., 2000).

2. Distribution anatomique et cellulaire

L'étude de la distribution du récepteur 5-HT2B dans l'organisme, aussi bien chez l'Homme que chez la souris, est difficile étant donné qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de bon anticorps contre ce récepteur. Cependant, des études par hybridation *in situ* ont montré la présence du récepteur 5-HT2B dans le foie, les poumons, le cœur, les reins, le placenta et le cerveau chez le rat (Choi and Maroteaux, 1996; Choi et al., 1994). Des études plus récentes ont permis de localiser l'expression de ce récepteur dans des régions spécifiques du cerveau tels que l'hippocampe (**Figure 19**), le noyau paraventriculaire du thalamus, les noyaux du raphé dorsal, le locus cœruleus, l'habénula, le cortex et le cervelet (Bonaventure et al., 2002).

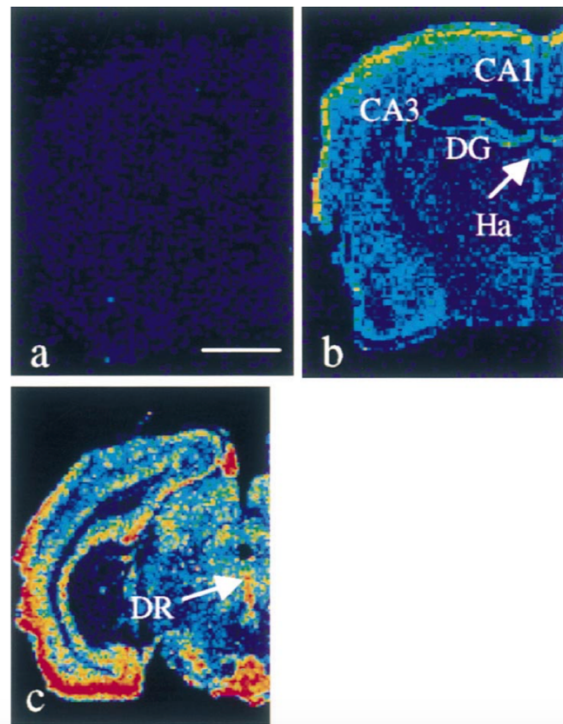


Figure 19 : Détection de l'ARN messager du récepteur 5-HT2B par hybridation *in situ*. Barre d'échelle : 0,3 cm (Bonaventure et al., 2002).

Par ailleurs, des analyses transcriptomiques du contenu cellulaire de neurones sérotoninergiques purifiés à partir de cerveau de souris adultes ont montré une expression du récepteur 5-HT2B dans certains noyaux du raphé (Okaty et al., 2015), confirmant les résultats issus de RT-qPCR sur cellule unique montrant l'expression de ce récepteur dans la majorité des neurones sérotoninergiques du raphé (identifiés par l'expression des marqueurs Tph2 et Pet-1) (Diaz et al., 2012). Enfin, ce récepteur a été détecté dans des cultures primaires de microglies ainsi que dans des microglies fraîchement purifiées à partir de cerveau de souris, montrant que le récepteur 5-HT2B est le principal récepteur à la sérotonine exprimé par les microglies (Kolodziejczak et al., 2015).

3. Pharmacologie

Afin d'établir un profil pharmacologique du récepteur 5-HT2B, des expériences par compétitions de ligands radiomarqués ont été faites, permettant d'obtenir l'affinité de ce récepteur pour ces ligands. Le récepteur 5-HT2B a une forte affinité pour son ligand endogène la 5-HT ($K_d \approx 10$ nM), et il est également la cible d'autres ligands des récepteurs 5-HT2, tels que des métabolites de composés thérapeutiques et drogues d'abus.

Actuellement, on dispose de molécules de synthèse ayant une forte affinité et une bonne sélectivité pour ce récepteur comme l'agoniste spécifique BW723C86 (Kennett et al., 1996) et les antagonistes sélectifs SB204741 (Smith Baxter, 1995) et RS127445 (Bonhaus et al., 1995) qui sont respectivement 10, 50 et 1000 fois plus affins pour les récepteurs 5-HT2B que pour les récepteurs 5-HT2A et 5-HT2C.

4. Couplages et voies de signalisation associées

Le récepteur 5-HT2B, comme les récepteurs 5-HT2, est principalement couplé à une protéine $G_{\alpha q}$ mais peut également être couplé à une protéine $G_{\alpha_{12/13}}$ (Manivet et al., 2000). Cependant, les RCPG activent d'autres voies de signalisation en interagissant avec des protéines telles que les protéines d'échafaudage cellulaire à domaine PDZ (pour revue (Romero et al., 2011)). Les principales voies de transductions du récepteur 5-HT2B sont représentées dans la **Figure 20** (Pour revue (Masson et al., 2012)).

Voie de la phospholipase C (PLC)

L'utilisation de lignées cellulaires exprimant transitoirement ou de façon stable le récepteur 5-HT2B (HEK293, AV-12 A600K-2-3-MTX, LMTK, 1C11, CHO) a permis de mettre évidence le couplage du récepteur 5-HT2B à la protéine $G_{\alpha q/11}$ (Kellermann et al., 1996). Ainsi, la stimulation du ce récepteur induit l'activation de la PLC qui hydrolyse le PIP2 en IP3 et DAG. Ce dernier active la protéine kinase C (PKC) induisant l'entrée de calcium Ca^{2+} dans la cellule via les canaux calciques de type L (Baxter et al., 1994; Cox and Cohen, 1995; Sandén et al., 2000). D'autre part, l'IP3 produite stimule la libération de Ca^{2+} contenu dans le réticulum endoplasmique (RE) vers le cytoplasme mais active également la phosphoinositide 3 kinase (PI3K) permettant la phosphorylation d'Akt.

Voie des MAPK/ERK

La stimulation du récepteur 5-HT2B induit également l'activation de la voie de signalisation des MAPK/ERK, via la protéine $G_{\alpha q/11}$. En effet, il a été montré que dans les lignées cellulaires de fibroblastes LMTK-, la sous-unité $\beta\gamma$ de la protéine $G_{\alpha q/11}$ active la voie Ras-GTPase qui phosphoryle ERK, acteur de la prolifération cellulaire. Dans les lignées cellulaires de fibroblastes, la sous-unité $\beta\gamma$ active également l'activation de la protéine tyrosine kinase Src induisant la transactivation du récepteur tyrosine kinase du PDGFR (récepteur du facteur de

croissance dérivé des plaquettes) (Maroteaux and Launay, 1996). La transactivation du PDGFR va permettre le recrutement de ERK1/2 et sa phosphorylation par la protéine Ras.

Voie de la phospholipase A2 et de l'acide arachidonique

Dans les lignées progénitrices neuronales 1C11, le récepteur 5-HT_{2B} peut également activer la phospholipase A2 (PLA₂) (Tournois et al., 1998) via la protéine G_{α12/13}. Son activation entraîne l'hydrolyse de la phosphatidylcholine et de la phosphatidyléthanolamine en acide arachidonique (AA). Cette production d'AA est à l'origine de la synthèse de prostaglandines (Tournois et al., 1998). L'activation de la PLA₂ active également la NADPH oxydase permettant la production de radicaux libres oxygénés (Schneider et al., 2006).

Voie du monoxyde d'azote NO et de la NO synthase NOS

Pour finir, le site de liaison des domaines PDZ du récepteur 5-HT_{2B}, situé dans sa partie C-terminale, permet le recrutement de la NO synthase constitutive (cNOS3) (Manivet et al., 2000) induisant ainsi la production intracellulaire de guanosine monophosphate cyclique (GMPC).

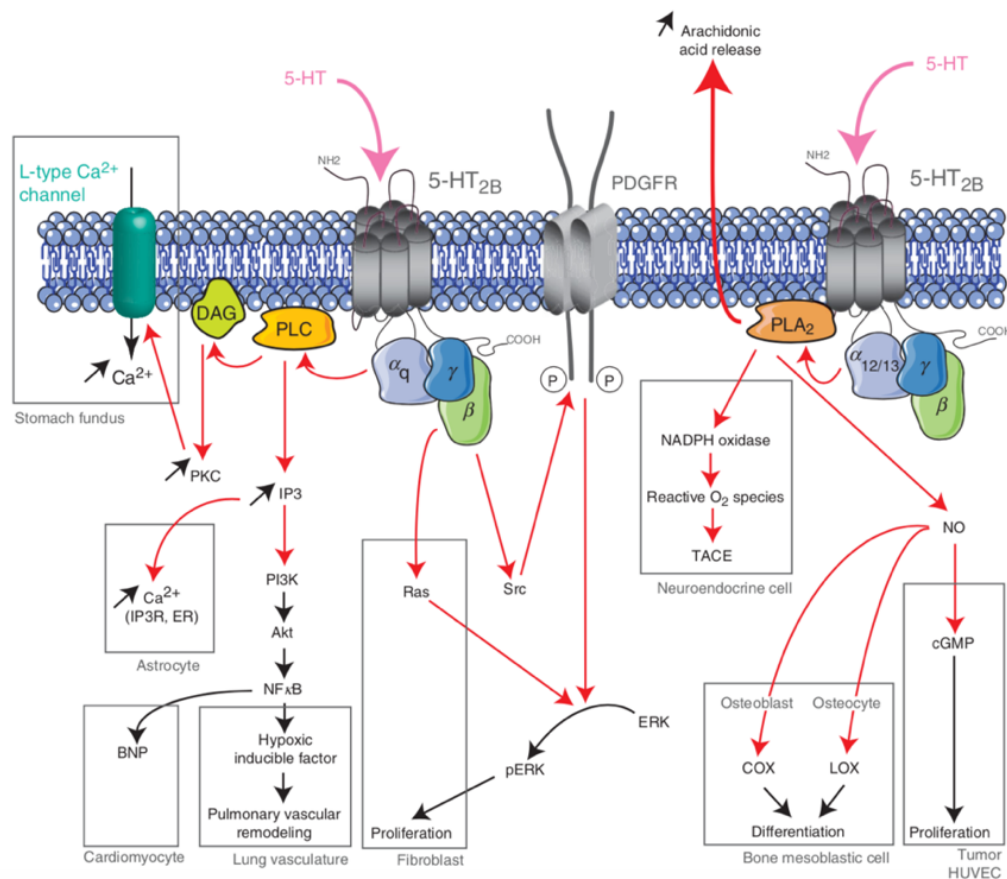


Figure 20 : Couplages et voies de signalisation associées au récepteur 5-HT_{2B}. Le récepteur 5-HT_{2B} est couplé à la protéine G_{αq} activant la voie de la PLC mais peut également être couplé à la protéine G_{α12/13} dans certains types cellulaires (Masson et al., 2012).

5. Oligomérisation

Comme expliqué dans le chapitre 2, les récepteurs sérotoninergiques ont la capacité de s'associer entre eux ou avec d'autres récepteurs métabotropiques et de former ainsi des homodimères ou des hétérodimères. Le récepteur 5-HT2B peut par exemple former des hétérodimères avec le récepteur sérotoninergiques 5-HT2A et 5-HT2C (Moutkine et al., 2017). Il forme également des hétérodimères avec les récepteurs à l'angiotensine AT1 dans des fibroblastes cardiaques (Jaffré et al., 2009). Je vais détailler ci-dessous l'impact de ces hétérodimérisations sur le couplage du récepteur 5-HT2B.

Hétérodimérisation avec les récepteurs 5-HT2A et 5-HT2C

Des études récentes du laboratoire ont montré l'existence d'hétérodimères 5-HT2A-5-HT2B et 5-HT2B-5-HT2C par co-immunoprécipitation et BRET sur des cellules COS-7 co-transfectées. De plus, la co-expression du récepteur 5-HT2C masque les sites de liaison du ligand du récepteur 5-HT2B, mais ceci n'empêche pas la production du second messager IP3. D'autre part, l'utilisation d'un antagoniste sélectif du récepteur 5-HT2B ne bloque pas la signalisation de l'hétérodimère tandis que l'utilisation d'un antagoniste sélectif du récepteur 5-HT2C bloque la signalisation et donc bloque la production d'IP3 de cet hétérodimère (Moutkine et al., 2017). Ces résultats démontrent que, dans l'hétérodimère 5-HT2B-5-HT2C mais aussi 5-HT2A-5-HT2C, il existe une asymétrie dans le couplage de la protéine $G_{\alpha q}$, et la signalisation des récepteurs 5-HT2A et 5-HT2B est bloquée et seul le récepteur 5-HT2C active la voie $G_{\alpha q}$ et donc la production d'IP3 (**Figure 21**).

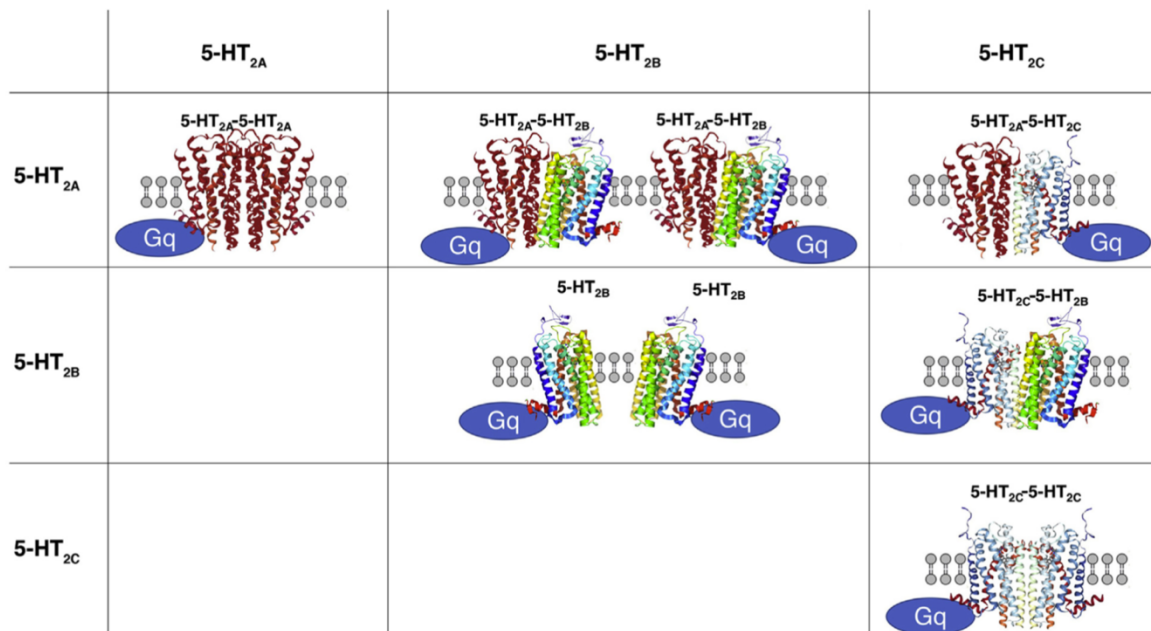


Figure 21 : Impact de l'hétérodimérisation des récepteurs 5-HT2A et 5-HT2B avec le récepteur 5-HT2C sur l'activation de la voie de signalisation $G_{\alpha q}$. (Maroteaux et al., 2019).

Hétérodimérisation avec le récepteur AT1

Dans les cultures primaires de fibroblastes cardiaques, les récepteurs de l'angiotensine II AT1 et les récepteurs 5-HT2B sont exprimés de manière endogène et partagent des voies de signalisation communes dépendantes des protéines $G_{\alpha q}$. L'activation de ces récepteurs provoquent l'activation de cette protéine $G_{\alpha q}$ induisant la libération de cytokines qui déclenche l'hypertrophie cardiaque (Jaffré et al., 2009). Le blocage de l'un ou l'autre de ces récepteurs empêche la libération de cytokines induite par l'activation de la protéine $G_{\alpha q}$ de l'autre récepteur. L'hétérodimérisation des récepteurs 5-HT2B et AT1 a été montrée dans des cellules COS-7 d'une part via microscopie confocale montrant leur colocalisation et d'autre part via la technique de Pull-down assay, une variante de la co-immunoprécipitation (Jaffré et al., 2009). Cependant, la signalisation de chaque récepteur n'est pas affectée par l'hétérodimérisation, laissant supposer de la présence d'une unique protéine $G_{\alpha q}$ par hétérodimère.

II. Fonctions physiologiques et pathologiques du récepteur 5-HT2B

1. Au niveau périphérique

Le rôle fonctionnel du récepteur 5-HT2B a été principalement établi dans les fonctions cardiaques, aussi bien pendant la période de développement qu'à l'âge adulte. En effet, des études ont montré que l'inactivation de ce récepteur entraîne une cardiopathie dilatée chez la souris à la naissance (Nebigil et al., 2001), ce qui provoque une augmentation de la létalité lors des premières semaines postnatales due à une hypoplasie ventriculaire. Cependant, les souris arrivant à l'âge adulte ne présentent plus de problèmes cardiaques. Par contre, la surexpression du récepteur 5-HT2B dans les cellules cardiaques induit une prolifération cellulaire excessive entraînant, entre autres, une hypertrophie des valves cardiaques. Ce modèle de surexpression du récepteur 5-HT2B est utilisé comme modèle d'hypertrophie cardiaque (Monassier et al., 2008; Nebigil et al., 2001, 2003).

Les récepteurs 5-HT2B semblent également être impliqués dans les fonctions respiratoires. En effet, dans un modèle murin d'hypertension pulmonaire (HTAP) on observe une augmentation de l'expression du récepteur 5-HT2B, induite par l'hypoxie. D'autre part, la stimulation de ce récepteur provoque le développement de l'HTAP en favorisant la prolifération de la vasculature pulmonaire (Launay et al., 2002). L'utilisation des souris génétiquement modifiées afin d'invalider l'expression du récepteur 5-HT2B prévient l'HTAP induite par l'hypoxie (Dumitrascu et al., 2011; Launay et al., 2002; Zopf et al., 2011).

2. Au niveau du système nerveux central

Une série d'études du laboratoire a montré que, dans le SNC, le récepteur 5-HT2B est impliqué dans diverses fonctions et son invalidation génétique chez la souris a permis de mettre en évidence son implication dans plusieurs maladies psychiatriques.

La prise alimentaire

Plusieurs études ont démontré le rôle du système sérotoninergique dans l'appétit et notamment dans les troubles alimentaires. Pendant plusieurs années, la molécule Dexfenfluramine (DF), un dérivé d'amphétamine aux propriétés anorexigènes, a été prescrite afin de traiter l'obésité chez les patients (Garfield and Heisler, 2009). La DF induit une libération massive de 5-HT via le transporteur SERT augmentant ainsi la concentration extracellulaire de 5-HT. Cependant, malgré son effet considérable contre l'obésité, ce traitement a dû être retiré du marché à cause d'effets secondaires désastreux tels que l'hypertension artérielle pulmonaire et des maladies cardiaques comme les valvulopathies (Fitzgerald et al., 2000; Launay et al., 2002; Rothman et al., 2000). Sachant que les souris invalidées pour le récepteur 5-HT2B présentent des malformations cardiaques, le laboratoire s'est intéressé aux effets de la DF sur des souris *Htr2b*^{+/+} et *Htr2b*^{-/-} mais également au rôle du récepteur 5-HT2B dans la prise alimentaire chez ces souris. Les effets anorexigènes de la Dexfenfluramine sont abolis chez les souris *Htr2b*^{-/-} et ces résultats ont été confirmés après un traitement aigu avec l'antagoniste du récepteur 5-HT2B, le RS 127445. D'autre part, des expériences de microdialyse ont permis de montrer que la DF induit un pic de 5-HT au niveau du thalamus une heure après injection, pic fortement diminué chez les souris *Htr2b*^{-/-}. Ces résultats indiquent que le récepteur 5-HT2B exprimés dans les neurones du raphé participent fortement à la libération de 5-HT par le SERT induite par la DF (Banas et al., 2011).

L'impulsivité

L'impulsivité est un comportement caractérisé par des actions sans anticipation, une diminution du contrôle inhibiteur ou une absence des considérations des conséquences (Winstanley et al., 2006). Des défauts de la fonction cognitive, de l'attention ou de l'appréhension de récompense sont des facteurs contribuant à l'impulsivité et sont observables dans les cas de suicide, d'addiction, de violence mais également dans l'hyperactivité, les déficits d'attention et divers troubles de la personnalité. Afin de déterminer des allèles associés à l'impulsivité, le séquençage du génome d'une population de criminels finlandais violents a permis d'identifier un polymorphisme perte de fonction du gène codant pour le récepteur 5-HT2B (HTR2B Q20*). Les conséquences de ce polymorphisme aussi bien sur des paramètres cognitifs (mémoire de travail) que biochimiques (taux de testostérone) ont été évaluées dans cette population.

Le polymorphisme HTR2B Q20* introduit un codon stop au niveau du 20^{ème} acide aminé (glutamine) entraînant une perte de fonction du récepteur 5-HT2B. Des études

complémentaires sur des souris *Htr2b*^{-/-} ont été réalisées et ont montré que la délétion du récepteur 5-HT2B entraîne une hyperlocomotion lors des transitions jours/nuit reflétant une augmentation de la locomotion en réponse à un nouvel environnement ainsi qu'une augmentation de l'activité exploratoire face à un nouvel objet. D'autre part, ces animaux présentent une intolérance au délai avant l'obtention d'une récompense ainsi qu'une augmentation des taux plasmatiques de testostérone. Ces données ont permis de mettre en évidence une adéquation des phénotypes des souris *Htr2b*^{-/-} avec les données établies chez les humains impulsifs portant le polymorphisme HTR2B Q20* (Bevilacqua et al., 2010).

La schizophrénie et les troubles psychotiques

Le laboratoire s'est également intéressé au rôle de ce récepteur dans les comportements de type psychotiques chez la souris. La délétion génétique ou pharmacologique du récepteur 5-HT2B est associée à des défauts d'interaction sociale, de mémorisation spatiale ainsi qu'une hyperlocomotion face à la nouveauté par rapport aux animaux sauvages (Doly et al., 2008). Cependant, certains de ces phénotypes peuvent être supprimés après un traitement chronique avec un antipsychotique, l'halopéridol, qui est un antipsychotique typique et antagoniste des récepteurs dopaminergiques D2. Ces résultats montrent que le système sérotoninergique, via le récepteur 5-HT2B, joue un rôle important dans les troubles types psychotiques chez la souris (Pitychoutis et al., 2015).

Cependant, il existe plusieurs types d'antipsychotiques différant par leur action sur les systèmes de neurotransmission. En effet, les antipsychotiques typiques, ou dits de première génération comme l'halopéridol, agissent principalement sur les récepteurs dopaminergiques D2. Les antipsychotiques atypiques, dits de seconde génération comme la clozapine ou l'aripiprazole, agissent quant à eux sur les récepteurs sérotoninergiques de type 2 5-HT2. La clozapine est capable de lier le récepteur 5-HT2B en exerçant un rôle antagoniste, des études supplémentaires sur l'effet de la clozapine sur les comportements des souris *Htr2b*^{-/-} sont à réaliser.

La dépression

Le transporteur SERT est utilisé comme cible principale pour les traitements liés à la dépression. En effet, la plupart des antidépresseurs font partie de la classe des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) et agissent sur le SERT en bloquant son activité de recapture de la 5-HT ce qui provoque une accumulation de la 5-HT extracellulaire, permettant ainsi que de moduler l'expression et l'activité des récepteurs sérotoninergiques des neurones pré et post-synaptiques. Le laboratoire s'est donc intéressé au rôle du récepteur 5-HT2B dans le traitement aigu ou chronique aux ISRS des souris. Ces études ont permis d'observer une absence de réponse aux antidépresseurs chez les souris *Htr2b*^{-/-} par rapport aux souris sauvages lors des tests de nage forcée. D'autre part, un traitement chronique aux ISRS induit des effets neurogéniques et stimule la prolifération cellulaire dans l'hippocampe chez des souris sauvages (Santarelli et al., 2003), mais ces effets ne sont plus observés chez les souris

Htr2b^{-/-} (Diaz et al., 2012). Ces résultats indiquent donc que l'absence du récepteur 5-HT2B chez la souris confère une résistance aux antidépresseurs.

Ainsi, les études du laboratoire ont permis de montrer que, par la délétion totale du récepteur 5-HT2B, ce récepteur est impliqué dans différents troubles psychiatriques. Il est cependant important de déterminer si une délétion partielle du récepteur 5-HT2B, dans un type cellulaire précis, est suffisante à l'apparition de ces troubles. En effet, l'impact des cellules microgliales dans la mise en place des troubles psychiatriques est à l'heure actuelle bien étudié (Pour revue (Tay et al., 2018)), il serait donc intéressant d'étudier l'impact de la délétion partielle du récepteur 5-HT2B spécifiquement dans les microglies sur le comportement des souris.

OBJECTIFS DE LA THESE

Les cellules microgliales, les macrophages résidents du cerveau, possèdent une morphologie hautement ramifiée avec de longs et fins prolongements. Il est maintenant connu que les microglies possèdent plusieurs rôles primordiaux que ce soit en conditions physiologiques ou pathologiques. En effet, grâce à leurs prolongements, les microglies sont capables de constamment surveiller leur environnement *via* des mouvements d'extension et de rétraction. Cette motilité des prolongements microgliaux, plus couramment appelée « surveillance microgliale » est une fonction cruciale des microglies dans le système nerveux central. En effet, la capacité des microglies à constamment surveiller leur environnement leur permet de jouer plusieurs rôles afin de détecter toute perturbation de l'homéostasie. Elles répondent à ces perturbations en libérant des facteurs solubles tels que les cytokines et en phagocytant les cellules en apoptose et débris. Les microglies interagissent également avec les neurones dans le but de moduler la plasticité synaptique et d'induire l'élagage synaptique. D'autre part, les microglies sont capables de projeter leurs prolongements en réponse à une lésion tissulaire située à un endroit précis, et ce mécanisme est connu pour être dépendant de l'activation du récepteur purinergique P2Y₁₂ par l'ATP/ADP extracellulaire libérées au niveau des sites de lésions. Par ailleurs, il a été montré que les fonctions microgliales sont régulées par différents neuromodulateurs tels que l'acétylcholine (ACh), l'histamine, la norépinephrine mais également la sérotonine (5-HT). Cependant, le rôle de la 5-HT sur les cellules microgliales reste encore peu connu.

Depuis plusieurs années, le laboratoire de Luc Maroteaux et Anne Roumier a axé ses recherches sur le rôle de la sérotonine sur les cellules microgliales montrant ainsi différents rôles de ce neurotransmetteur. Il a été montré, par immunohistochimie, des contacts très étroits entre les microglies et les varicosités sérotoninergiques dans le cerveau suggérant que la sérotonine module les microglies. De plus, on sait que parmi les différents types de récepteurs sérotoninergiques, le récepteur 5-HT_{2B} est le principal récepteur à la sérotonine exprimé par les microglies et il est nécessaire à la motilité directionnelle des prolongements des microglies vers une application locale de 5-HT.

Au vu de ces résultats, j'ai axé mon projet de thèse sur la compréhension du mécanisme impliqué dans la motilité directionnelle des prolongements des microglies induite par la sérotonine. En effet, il est primordial de connaître les voies de signalisation impliquées par la sérotonine sur les changements morphologiques des prolongements des microglies. Ainsi, les objectifs de ma thèse se regroupent en trois grandes parties présentées dans la partie résultats et résumées ci-dessous.

La première partie de mon projet de recherche a consisté à développer et mettre au point la technique d'imagerie bi-photonique sur des tranches aigües de cerveau de souris afin d'imager au cours du temps la motilité des cellules microgliales. Les microglies étant très réactives à leur environnement et à toutes modifications physiologiques, les principaux enjeux de cette technique ont été d'optimiser la technique de préparation des tranches aigües de cerveau afin de minimiser au maximum l'activation des microglies mais également les paramètres d'acquisitions au microscope bi-photonique. Toutes ces optimisations ont permis la publication d'un article de méthodologie présenté dans la première partie des résultats sous le nom « *Two-*

photon imaging of microglial processes' attraction toward ATP or serotonin in acute brain slices » paru dans *The Journal of Visualized Experiments* le 11/01/2019.

Grâce au développement de cette technique au sein du laboratoire, j'ai pu ainsi étudier le rôle du récepteur 5-HT_{2B} microglial dans l'attraction des prolongements des microglies vers la sérotonine. J'ai, pour ce faire, utilisé aussi bien des souris transgéniques que des composés pharmacologiques. Le laboratoire possédant un grand nombre de lignée de souris transgéniques, j'ai pu générer mes propres lignées afin d'obtenir des souris invalidées pour l'expression du récepteur 5-HT_{2B} spécifiquement dans les microglies sous le contrôle de la Cre recombinase inducible (CreERT2). J'ai ainsi pu comprendre le mécanisme d'action de la sérotonine sur la motilité des prolongements des microglies en combinant de l'imagerie bi-photonique en temps réel avec des études *in vitro* en utilisant des cellules COS-7 afin de déterminer le profil pharmacologique du récepteur 5-HT_{2B} sa signalisation après stimulation à la sérotonine.

Pour finir, dans la troisième partie de ma thèse, je me suis penchée sur un autre enjeu de mon projet de recherche qui a été de moduler l'activité des cellules microgliales, et notamment leur motilité, en utilisant des outils chemogénétiques, couramment utilisés dans le domaine des Neurosciences : Les récepteurs DREADD. Des souris transgéniques ont été générées afin d'exprimer les récepteurs DREADD couplés à la protéine G_{αq} (hM3Dq) uniquement dans les microglies. Cependant, je me suis heurtée à problème inattendu lors de l'utilisation des différents ligands de ces récepteurs. En effet, ces ligands, qui sont des antipsychotiques ou des dérivés, ont un effet sur la motilité des prolongements des microglies en l'absence de l'expression des récepteurs. J'ai donc orienté mes recherches sur les effets et la modulation des antipsychotiques, tels que la clozapine, sur les microglies, un domaine de recherche encore peu étudié à l'heure actuelle.

RESULTATS

I - Méthode principale

Imagerie bi-photonique de la motilité des prolongements microgliaux

Imagerie bi-photonique de la motilité orientée des prolongements des microglies vers l'ATP ou la sérotonine sur tranches aigües de cerveau

Publié le 11 Janvier 2019 dans le journal « Journal Of Visualized Experiments »

1. Contexte

Au cours de ces dernières années, plusieurs études ont montré que les microglies étendent et rétractent constamment leurs prolongements ce qui leur permet de surveiller leur environnement et de détecter les perturbations de l'homéostasie dans le cerveau (Nimmerjahn et al., 2005). De plus, les microglies répondent très rapidement à des lésions locales en orientant la croissance de leurs prolongements vers le site de la lésion, un phénomène parfois appelé « motilité directionnelle ». Cet effet sur les prolongements microgliaux nécessite un gradient d'ATP et est médié par le récepteur purinergique P2Y₁₂ (Davalos et al., 2005; Haynes et al., 2006). De précédentes études du laboratoire ont montré que les microglies répondent aussi à une application locale de 5-HT par une réorientation de leurs prolongements vers le site de l'application (Kolodziejczak et al., 2015). Le principal objectif de ma thèse a été de caractériser cette réponse microgliale à la 5-HT par microscopie à deux photons sur des tranches aigües de cerveau de souris. Afin d'étudier ce mécanisme d'action, j'ai optimisé la préparation des tranches aigües de cerveau de souris et leur maintien dans des conditions physiologiques pour préserver la morphologie et la motilité des microglies. Pour facilement quantifier l'attraction des prolongements des microglies vers la 5-HT ou l'ATP, j'ai adapté une méthode d'analyse basée sur la mesure de l'intensité de fluorescence au cours du temps dans une région centrée sur le site de l'application locale des différents composés.

Toutes les optimisations de ce protocole nous ont permis de publier un article intitulé “*Two-photon imaging of microglial processes' attraction toward ATP or serotonin in acute brain slices*”, dans lequel je suis premier auteur, dans le journal *The Journal of Visualized Experiments* le 11 Janvier 2019

2. Description du protocole

L'objectif de cette publication est de partager un protocole expliquant comment imager la motilité des prolongements des microglies, notamment leur attraction vers la 5-HT, en utilisant la microscopie bi-photonique sur des tranches aigües de cerveau de souris. La première partie du protocole est consacrée à la préparation des tranches aigües de cerveau, une étape cruciale pour l'imagerie de la motilité des prolongements des microglies. En effet, ces cellules répondent très rapidement à toute sorte de perturbations de l'homéostasie et cette haute réactivité des

microglies rend le maintien de ces cellules dans des conditions physiologiques difficiles en tranche aigüe.

Les principales informations à retenir dans ce papier de méthode sont les suivantes :

- L'optimisation de la préparation des tranches aigües de cerveau permet de réduire l'excitotoxicité afin de maintenir les microglies dans des conditions proche de leur état physiologique.
- La création, par imprimante 3D, d'un porte-tranche qui permet de maintenir les tranches à l'interface air/solution entre le moment de leur préparation et celui de leur utilisation.
- La création, par imprimante 3D, d'une chambre qui permet de faire circuler l'ACSF, et donc d'oxygéner, à la fois au-dessus et en dessous de la tranche pendant toute la durée de l'acquisition.
- L'optimisation et la discussion du protocole d'analyse des films obtenus, permet d'analyser l'attraction des prolongements microgliaux vers la 5-HT ou l'ATP facilement et de manière robuste.

3. Contribution personnelle

Dans cette étude j'ai optimisé la préparation des tranches aigües de cerveau, les paramètres d'acquisition permettant d'avoir des images avec suffisamment de détails et d'intensité tout en évitant une photo-toxicité, et j'ai choisi, optimisé et contrôlé la méthode d'analyse de l'attraction des prolongements microgliaux à la 5-HT.

Video Article

Two-photon Imaging of Microglial Processes' Attraction Toward ATP or Serotonin in Acute Brain Slices

Fanny Etienne^{1,2,3}, Vincenzo Mastrolia^{1,2,3}, Luc Maroteaux^{1,2,3}, Jean-Antoine Girault^{1,2,3}, Nicolas Gervasi^{*1,2,3}, Anne Roumier^{*1,2,3}¹Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), Institut du Fer-à-Moulin (UMR-S 839)²Sorbonne Université³Institut du Fer à Moulin

*These authors contributed equally

Correspondence to: Nicolas Gervasi at nicolas.gervasi@inserm.fr, Anne Roumier at anne.roumier@inserm.frURL: <https://www.jove.com/video/58788>DOI: [doi:10.3791/58788](https://doi.org/10.3791/58788)

Keywords: Microglia, multi-photon microscopy, acute brain slices, chemoattraction, motility, morphology, serotonin, ATP, live imaging, time-lapse imaging

Date Published: 1/11/2019

Citation: Etienne, F., Mastrolia, V., Maroteaux, L., Girault, J.A., Gervasi, N., Roumier, A. Two-photon Imaging of Microglial Processes' Attraction Toward ATP or Serotonin in Acute Brain Slices. *J. Vis. Exp.* (), e58788, doi:10.3791/58788 (2019).

Abstract

Microglial cells are resident innate immune cells of the brain that constantly scan their environment with their long processes and, upon disruption of homeostasis, undergo rapid morphological changes. For example, a laser lesion induces in a few minutes an oriented growth of microglial processes, also called "directional motility", toward the site of injury. A similar effect can be obtained by delivering locally ATP or serotonin (5-hydroxytryptamine [5-HT]). In this article, we describe a protocol to induce a directional growth of microglial processes toward a local application of ATP or 5-HT in acute brain slices of young and adult mice and to image this attraction over time by multiphoton microscopy. A simple method of quantification with free and open-source image analysis software is proposed. A challenge that still characterizes acute brain slices is the limited time, decreasing with age, during which the cells remain in a physiological state. This protocol, thus, highlights some technical improvements (medium, air-liquid interface chamber, imaging chamber with a double perfusion) aimed at optimizing the viability of microglial cells over several hours, especially in slices from adult mice.

Video Link

The video component of this article can be found at <https://www.jove.com/video/58788/>

Introduction

Microglial cells are the brain's resident macrophages and play a role in both physiological and pathological conditions^{1,2}. They have a highly branched morphology and are constantly extending and retracting their processes^{3,4}. This "scanning" behavior is believed to be related and necessary to the survey of their surroundings. The morphological plasticity of microglia is expressed in three modes. First, some compounds rapidly modulate microglial morphology: the addition of ATP^{5,6} or NMDA^{5,7} in the medium bathing acute brain slices increases the complexity of microglial ramifications, whereas norepinephrine decreases it⁶. These effects either are directly mediated by microglial receptors (for ATP and norepinephrine) or require an ATP release from neurons (for NMDA). Second, the growth and retraction speed of microglial processes, called motility or "surveillance", can be affected by extracellular factors⁸, homeostasis disruptions^{9,10}, or mutations^{9,10,11}. Third, in addition to these isotropic changes of morphology and motility, microglia have the capacity to extend their processes directionally toward a pipette delivering ATP^{3,5,12,13,14}, in culture, in acute brain slices or *in vivo*, or delivering 5-HT in acute brain slices¹⁵. Such oriented growth of microglial processes, also called directional motility, was first described as a response to a local laser lesion^{3,4}. Thus, physiologically, it may be related to the response to injury or required for targeting microglial processes toward synapses or brain regions requiring pruning during development^{15,16}, or in physiological^{17,18,19} or pathological situations^{9,18,19,20} in adulthood. The three types of morphological changes rely on different intracellular mechanisms^{17,13,20}, and one given compound does not necessarily modulate all of them (*e.g.*, NMDA, which acts indirectly on microglia, has an effect on morphology but does not induce directional motility^{5,7}). Therefore, when aiming to characterize the effect of a compound, a mutation or a pathology on microglia, it is important to characterize the three components of their morphological plasticity. Here, we describe a method to study the directional growth of microglial processes toward a local source of compound, which is, here, ATP or 5-HT.

There are several models to study microglia processes' attraction: primary cultures in 3D environment^{6,18,19}, acute brain slices^{6,13,15}, and *in vivo* imaging^{3,13}. The *in vivo* approach is the best to preserve the physiological state of microglia. However, intravital imaging of deep regions requires complex surgical procedures and, therefore, it is often limited to superficial cortical layers. The use of microglia primary culture is the easiest technique to test a large number of conditions with a limited number of animals. Nevertheless, it is impossible to obtain the same cell morphology as *in vivo*, and cells lose their physiological interactions with neurons and astrocytes. Acute brain slices represent a compromise between these two approaches. This model allows researchers to study brain structures which are otherwise difficult to reach and to image with high resolution *in vivo*, and to investigate slices from neonatal stages, whereas transcranial microscopy is mostly performed at adulthood. Finally, it makes it possible to observe in real-time the effects of local drug application, and to repeat experiments while using a limited number of

animals. Nonetheless, an issue with acute brain slices is the limited time (a few hours) during which the cells remain alive, notably for slices from mice older than two weeks, and the potential change of microglia morphology over time^{21,22}.

Here, we describe a protocol to prepare acute brain slices of young and adult Cx3cr1^{GFP/+} mice up to two months old, with the preservation of microglia morphology and motility for several hours. We, then, describe how to use these slices to study the attraction of microglial processes toward compounds like ATP or 5-HT.

Protocol

All experiments were approved by the local ethical committee (Darwin Committee, agreements #1170 and #10921).

1. Preparation of Glass Micropipettes for the Local Application of Compounds

1. Prepare pipettes from borosilicate thin-wall glass capillaries with an electrode puller. Adjust the parameters to obtain pipettes with a 4 - 5 μm diameter at their extremity. **Figure 2D** shows one pipette in brightfield at low magnification.

2. Solutions

1. Ensure that only glassware that has been cleaned by an autoclave cycle, followed by rinsing 2x - 3x with ultrapure water, will be used. Never use glassware that has been in contact with paraformaldehyde.
2. Prepare a $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 stock solution by dissolving 14.7 mg of $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 50 mL of water of high purity (ultrapure water, resistance 18.2 M Ω ; the traces of metal in distilled water or tap water can lead to suboptimal slice quality due to pro-oxidative effects).
 1. Store this stock solution at room temperature for a maximum of one month.
3. On the day of the experiment, prepare 1 L of choline-aCSF (artificial cerebrospinal fluid) solution, whose composition is $110 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ choline Cl, $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ glucose, $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO_3 , $7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $11.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ascorbic acid, $3.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium pyruvate, $2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, $1.25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 , and $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 , 0.5.
 1. To prepare this solution, add, in the following order, to a 1 L graduated flask: 0.186 g of KCl, 0.195 g of NaH_2PO_4 , 2.04 g of acid ascorbic, 2.1 g of NaHCO_3 , and 4.5 g of glucose.
 2. Fill about half of the final volume with ultrapure water and stir until complete dissolution.
 3. Add 0.34 g of sodium pyruvate and 15.36 g of choline Cl.
NOTE: It is convenient to first dissolve the choline Cl with 5 to 10 mL of the solution prepared in step 2.3.2 before adding it to the whole solution.
 4. Add 7 mL of $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 and 250 μL of $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 (prepared in step 2.2) to the solution.
 5. Fill the graduated flask up to 1 L with ultrapure water.
 6. With a vapor pressure osmometer, check that the osmolarity is between 300 and 310 m Ω . If not, adjust it with glucose.
 7. Check the pH after carbogenation (*i.e.*, bubbling with "carbogen", a mix of 95% O_2 /5% CO_2) and adjust it, if necessary, to 7.3 - 7.4 with 10 M NaOH.
 8. Transfer the solution to a glass bottle for storage. Keep the bottle in the fridge until use (STEP 3.1).
NOTE: It is recommended to make a fresh solution on the day of the experiment. However, if necessary, choline-aCSF can be stored up to two days at 4 $^\circ\text{C}$.
4. On the day of the experiment, prepare 1 L of an aCSF solution, whose composition is $124 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, $26.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO_3 , $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ glucose, $2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 , $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , and $1.25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 .
 1. To prepare this solution, add, in the following order, to a graduated flask: 0.150 g of NaH_2PO_4 , 0.186 g of KCl, 2.2 g of NaHCO_3 , 4.5 g of glucose, and 7.3 g of NaCl. Bring the solution to a volume of 1 L with ultrapure water and stir it vigorously on a stir plate.
 2. Add 1 mL of $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 and 1 mL of $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 to the solution and transfer the aCSF solution to a glass bottle for storage.
 3. Check whether the osmolarity is 300 - 310 m $\Omega\cdot\text{L}^{-1}$ and, if not, adjust it with glucose.
 4. Check the pH after carbogenation (*i.e.*, bubbling with "carbogen") and adjust it, if necessary, to 7.3 - 7.4 with 10 M NaOH.
 5. Transfer the solution to a glass bottle for storage. Keep the bottle in the fridge until use (step 3.1).
NOTE: It is recommended to make a fresh solution on the day of the experiment. However, an alternative is to prepare a 10x stock solution containing NaCl, NaHCO_3 , KCl, and NaH_2PO_4 at 10x the final concentration, which can be stored for no more than one week at 4 $^\circ\text{C}$. Make the final aCSF on the day of the experiment by diluting the 10x stock solution with ultrapure water and adding the glucose, CaCl_2 , and MgCl_2 .
5. Prepare the drug solutions on the day of the experiment. Use the aCSF solution to bring them to the final concentrations which are, here, $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for ATP and $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 5-HT.
NOTE: For ATP, a stock solution can be prepared (*e.g.*, 50 mM ATP in water), stored in aliquoted form at -20 $^\circ\text{C}$, and diluted with aCSF to the final concentration on the day of the experiment. In contrast, the 5-HT (serotonin-HCl) solution must be prepared from powder on the day of the experiment, at $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in water, kept at 4 $^\circ\text{C}$ to avoid 5-HT oxidation, and diluted in aCSF at the time of the experiment.

3. Preparation of Acute Brain Slices

1. **Preparation of the dissection area**
 1. Prepare 70 mL of ice-cold choline-aCSF in an 80 mL beaker placed on ice, to be used for cardiac perfusion, rapid cooling down of the brain, and slicing. Prepare 150 mL of choline-aCSF in a 200 mL crystallizing dish, placed in a heated water bath maintained at 32 $^\circ\text{C}$. Place a nylon mesh strainer in the crystallizing dish to retain the slices. This will be used to let the slices recover for 10 min just after slicing.

2. At least 30 min before starting the dissection (section 3.2), start bubbling these two solutions (70 mL of choline-aCSF on ice and 150 mL of choline-aCSF at 32° C) with carbogen. Maintain constant carbogenation during the entire procedure.
3. Prepare the interface chamber device (**Figure 1C**), which will be used to keep slices until their use.
 1. In a sealed food box (10 x 10 cm or 10 cm in diameter, 8 cm in height), installed on a magnetic stirrer, place a 200 mL crystallizing dish with a bar magnet.
 2. Add 200 mL of aCSF in this crystallizing dish and place the 3D-printed interface slice holder on top of it (the interface slice holder is composed of two perfectly fitting parts, with a polyamide mesh stretched between them, **Figure 1A,B**).
 3. Remove excess volume from the crystallizing dish to keep only a thin film of solution covering the mesh of the interface slice holder. This will later create a fine rim of solution surrounding the slices (but without covering them).
 4. Put a few millimeters of aCSF at the bottom of the food box and start bubbling it with carbogen (at first use, make a small hole in the sealed food box wall to make sure the tubing can enter the box).
 5. Close the sealed box while maintaining constant carbogenation. This will create a humidified 95% O₂/5% CO₂ rich environment in which the slices will be transferred after their recovery in choline-aCSF and maintained before they are imaged. This device is hereafter referred to as the "interface chamber" (**Figure 1C**).

2. Brain dissection and slicing

1. Anesthetize the mouse with an intraperitoneal injection of 50 mg·mL⁻¹ pentobarbital (0.15 mL /20 g of mouse body weight), immobilize it, expose the heart, and perform a cardiac perfusion with 10 mL of ice-cold, carbogenated, choline-aCSF (see step 3.1.1), with a peristaltic pump. Observe the pallor of the liver as an indicator of a good perfusion. The perfusion lasts less than 5 min.
2. Decapitate the mouse and cut the skin to expose the skull. With big scissors, apply two transversal cuts from the large foramen and one long sagittal cut and, using fine forceps, remove the skull plates.
3. Quickly and gently extract the brain (in less than 1 min) and place it for 1 min in the 80 mL beaker containing the remaining (~60 mL) ice-cold choline-aCSF (still under constant carbogenation), in order to cool it down.
4. Transfer the brain onto a filter paper previously wet with aCSF.
5. Cut out the brain according to the brain region of interest and preferred angle of slicing. For example, to image the thalamus or the hippocampus on coronal slices, cut out with a scalpel blade the cerebellum and, then, about 2 mm from the rostral and caudal extremities of the brain.
NOTE: It is important to remove brain parts that are too rostral or too caudal because the smaller the region to trim before reaching the area of interest, the faster the slicing. A total time for slicing (step 3.2.7) of less than 20 min is recommended.
6. For coronal slices, position and glue (with cyanoacrylate glue) the caudal face of the brain onto a 10 cm Petri dish, glued on the cutting block and filled with all the remaining ice-cold choline-aCSF. The block with the dish is, then, positioned in the reservoir chamber of the vibrating slicer, which is positioned in a larger chamber filled with ice.
7. While keeping constant the 95% O₂/5% CO₂ bubbling of the ice-cold choline-aCSF, cut 300 µm-thick coronal slices (speed: 0.08 mm·s⁻¹, blade vibration: 60 Hz, vibration amplitude: 1 mm).
8. Collect the brain slices with a wide-mouth (4 mm in diameter) disposable transfer pipette, one by one after every single pass of the blade, to avoid the accumulation of toxic components released by the periphery of the slices. Take care to avoid air bubbles during the transfer and place each slice in the choline-aCSF at 32 °C for about 10 min for recovery.
9. With the transfer pipette, place the slices onto pieces of lens-cleaning paper topped with a drop of choline-aCSF. Aspirate the excess of choline-aCSF and, with the spatula, place the slices, laid on the lens-cleaning tissue, on the mesh of the interface chamber containing carbogenated aCSF at room temperature (see 3.1.3.5). Let the slice recover in this environment for at least 30 min.
NOTE: After this, the slices are ready and can be used for microglia imaging for up to 6 h after the brain extraction from young (less than one-month-old) mice and up to 4 h after the brain extraction from two-months-old adults.

4. Two-photon Microscopy

1. Parameters setting

1. Switch on the multiphoton system (hybrid detectors, laser, scanner, electro-optic modulator, microscope).
2. Tune the laser at 920 nm, check that the laser is mode-locked, and set the power at 5% - 15% and the gain at 10%. This corresponds to a power of 3 - 5 mW under the objective. Ensure that the nondescanned detectors are engaged and the appropriate emission and excitation filters installed.
3. Set parameters of the imaging software to the following values: for the frame size, 1024 x 1024 pixels corresponding to an area of 295.07 x 295.07 µm; for the zoom, 2. If the signal is very noisy, apply a line average of 2. For the pixel dynamics, set the imaging software at 12 bits or more.
NOTE: Images with a higher bit value allow researchers to distinguish smaller differences in fluorescence intensity than images with a lower bit value: a change of one gray value in an 8-bit image would correspond to a change of 16 gray values in a 12-bit and of 256 gray values in a 16-bit image. Therefore, higher-bit images are more appropriate for quantitative analysis, but as their size increases with bit depth, storage capacity, and computing power can become limiting.
4. Select the scan mode XYTZ with a Z-interval range at 2 µm and a T-interval of 2 min.
NOTE: The x,y and z resolution are determined by the Nyquist sampling theorem. A Z-step size around 0.8 would be optimal to resolve microglia processes (with a diameter of <1 µm), but the optical resolution of multiphoton microscopy is limiting (at 920 nm with a 0.95 NA objective, the axial resolution is around 1 µm). On top of that physical barrier, in a live-imaging experiment, the sensitivity or signal-to-noise ratio, the resolution, the speed, and the total observation time matter. Taking into account all these parameters, a z-step of 2 µm (as in numerous studies^{3,11,14}), an image size of 1024 x 1024 pixels, and a high-speed acquisition using a resonant scanner coupled to HyD detectors (it takes around 15 s to acquire 50 z-plans) were selected here. The frequency of acquisitions is one XYTZ series every 2 min and the total duration is 30 min. If the set-up is not fast or sensitive enough, it is possible to reduce the lateral resolution (down to 512 x 512) or the number of z-slices (by imaging exclusively in the z-depth which exhibits the strongest fluorescence [*i.e.*, not the deepest z-slices where fluorescence is faint]), or to decrease the speed of the scanner. The axial resolution

can also be decreased by increasing the z-step up to 3 μm , but as this may impact the quantification, all experiments to be compared should be performed with the same z-step.

NOTE: It is possible to perform similar experiments on slices from CX3CR1creER-YFP mice¹⁸, a mouse line used to induce genetic deletion in microglia only, and in which microglia constitutively express yellow fluorescent protein (YFP). However, the expression level of YFP is very low compared to green fluorescent protein (GFP) in CX3CR1^{GFP/+} mice; thus, imaging is possible but challenging and requires the optimization of the acquisition parameters. It is recommended to adjust them as follows.

5. Tune the laser at 970 nm (which is better adapted to YFP excitation than 920 nm), the power at 50%, and the gain at 50%, which corresponds to a laser power under the objective of 5 - 6 mW.
6. Set a line average of 4 (or more) to improve the signal-to-noise ratio.

2. Positioning of the slice and of the glass micropipette, and the local application of the compound

1. Connect the peristaltic pump to the recording chamber, 30 min before starting the recording. After cleaning the whole perfusion system with 50 mL of ultrapure water, start the perfusion of the recording chamber with aCSF (50 mL) contained in a glass beaker under constant carbogenation. Throughout the experiment, keep the circulating aCSF to 32 °C with an inline microheater or a Peltier heater. NOTE: A specific perfusion chamber with top and bottom perfusion is designed to optimize the oxygenation on both sides of the slice. The perfusion chamber is composed of two perfectly fitting parts, with a polyamide mesh stretched between them (**Figure 2A,B**). Compared with other types of chambers, where the slice is directly laying on a glass coverslip, this chamber reduces neuronal death in the bottom part of the slice, improves viability, and reduces the slice movements induced by its swelling.
2. With a wide-mouth disposable transfer pipette, transfer the brain slice to be imaged to the aCSF beaker to remove the lens paper, let it sink (as a proof that no air bubble is attached), and transfer it to the recording (perfusion) chamber.
3. Position a slice holder (a hairpin made of platinum with the two branches joined by parallel nylon threads) on the slice to minimize slice movement due to the perfusion flow.
4. Use the bright-field illumination to target the brain region of interest (exposure time: 50 to 80 ms) using a low magnification objective (5X or 10X). Switch to the higher magnification (25X with a 0.35X lens) water immersion objective and adjust the position. NOTE: Avoid to image fields close to the slice holder's nylon threads as they can block the light and locally deform the slice. Make sure that the area of interest is flat. If necessary, remove the slice holder in order to reposition the slice and/or the slice holder.
5. Use the fluorescence illumination to locate fluorescent microglial cells to be imaged in the field (exposure time: 250 - 500 ms). NOTE: This step allows researchers to check the presence of cells in the region of interest and their fluorescence intensity, and to control for the amount of cellular debris.
6. Backfill the pipette with 10 μL of aCSF with ATP, 5-HT, or the drug of interest at its final concentration. Point the tip downward and gently shake the drug-filled pipette to remove any air bubbles trapped in the tip. NOTE: If the solution to be injected tends to form bubbles, consider using borosilicate pipettes with an internal filament. Leakage of ATP out of the pipette can attract microglial processes even before the injection (if this occurs, it will be visible at the analysis step). Although this should be moderate with the ATP concentration used ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), if it is an issue, consider prefilling the micropipette with 2 mL of aCSF prior to adding the ATP (or other compound) solution at step 4.2.6.
7. Mount the filled pipette in a pipette holder, connected with transparent tubing to a 5 mL syringe, with a plunger positioned at the 5 mL position. The pipette holder itself is mounted onto a three-axis micromanipulator.
8. Under bright-field illumination, use the micromanipulator to position the pipette in the center of the field. For a reproducible and optimal centering, display and use the rulers on the image.
9. Lower the pipette gently toward the slice, controlling and adjusting the objective at the same time, until the pipette tip lightly touches the surface of the slice. Stopping the descent of the pipette as soon as it is visible that the slice has been touched allows the pipette tip to penetrate 80 - 100 μm of the surface of the slice (see **Figure 3B**).
10. Tune the laser (see the parameters above) and switch the microscope to the multiphoton mode. Make sure that the chamber is screened from any light source (e.g., a computer screen). Switch on the nondescanned detectors and set the gain. Use a lookup table (LUT) with a color-coded upper limit to avoid saturating the pixels in the image.
11. Determine the thickness of the slice to be imaged (i.e., the upper and lower z-positions where fluorescence is detectable [usually between 220 and 290 μm in total]). NOTE: At the surface of the slice, there is an increased density of processes and possibly of microglia, often with an unusual morphology, in comparison with the inside of the slice. This accumulation will be more striking with time (i.e., more visible in the last than in the first brain slice to be imaged). Therefore, the z-planes in the first ~30 μm should not be used for the analysis and can even be skipped for the acquisition.
12. Start recording for a total duration of 30 min (or more if desired) and after a 5 min baseline, locally apply the compound to be tested (without interrupting the imaging). To do this, slowly press the plunger of the syringe connected to the micropipette, from the 5 mL to the 1 mL position (in about 5 s). Resistance when pressing the plunger must be felt immediately. If not, the tip might be broken. NOTE: For a trained experimenter, the injections with this method are reproducible, but alternatively to the manual manipulation of a syringe, the pipette could be linked to an automated pressure ejection system to allow a better control of the volume delivered. The injection creates a physical distortion of the slice at the site of the injection. This distortion is visible *a posteriori* in the first two or three images after the injection but should not be visible on the fourth image, (i.e., 8 min after the injection). If it persists, consider changing the parameters for the pipette preparation.
13. At the end of the acquisition (30 min), discard the micropipette and remove the slice. If desired, fix the slice for further immunolabeling. For example, the SNAPSHOT method is optimized for the fixation and staining of thick slices²³.
14. Prior to starting to image a new slice, make the 2D movie (section 5.1) in order to check that microglia have a normal morphology and are moving and, thus, that the slices are healthy.

5. Analysis of the Attraction of Microglial Processes

1. 2D projection and drift correction

1. Open the file (.LIF) with Fiji²⁴.

2. If necessary, make a substack (**Image/Stacks/Tools/Make Substack**) with only the z-planes of interest. For example, exclude the z-planes corresponding to the surface of the slice if they have been acquired but are not to be used for the analysis (see the NOTE after step 4.2.11) and the deepest z-planes with no fluorescence. The final stack generally contains 90 - 110 z-slices (180 - 220 μm).
 3. Launch the **Z project** function (**Image/Stacks/Z Project**) and select the **Max Intensity** projection type to make the projections of the z-stack acquired at each time point.
 4. Launch the **MultiStackReg** plugin (**Plugin/Registration/MultiStackReg**), selecting **Action 1: Align** and **Transformation: Rigid Body** to correct slight drifts that may have occurred during the acquisition. Save this 2D movie as a new file (.TIFF).
2. **Data processing**
1. Open this new file with Icy²⁵.
 2. Draw a circular **R1** region of interest (ROI) of 35 μm in diameter, centered on the injection site (identified notably by the shadow of the pipette and the distortion created at the time of injection).
 3. Use the plugin **ROI intensity evolution** and measure the mean intensity over time in R1.
 4. Save the results to an .XLS file.

3. **Quantification and representation of the results**

1. To quantify the microglial response over time, determine at each time point

$$R(t) = \frac{[R1(t) - \bar{R1}(0)]}{\bar{R1}(0)}$$

Here, $\bar{R1}(0)$ is the mean of the R1(t) values before the injection. Then, the results can be represented as a kinetic of the microglial response, or at a specific time point (see **Figure 7**).

Representative Results

This protocol describes a method to induce, observe, and quantify the oriented growth of microglial processes toward a locally applied compound, for example, ATP or 5-HT, in acute brain slices from young or adult (at least up to two-month-old) mice. Among the factors that contribute to maintaining brain slices from adult animals in a healthy state for several hours is the use of two tools designed to optimize cell survival at two steps of the protocol. First, the interface slice holder in the interface chamber (**Figure 1**) improves the conservation of the slices after cutting. Second, the recording chamber (**Figure 2**) has a perfusion system which allows the aCSF to run both at the top and at the bottom of the slice during imaging. The recording chamber dimensions used here are set to fit standard microscopes as they are similar to classical bath chamber inserts (with a 62 mm outer diameter), but as their models are downloadable from the **Supplemental Material**, the design can be adapted to fit in slice holders of other dimensions. To note is that each chamber is made by the assembly, without glue, of two perfectly fitting parts, with a polyamide mesh stretched between them.

To deliver ATP or 5-HT in a small area and induce a local response of microglia, a pipette containing the compound (visible in **Figure 2C,D**) is placed with its tip on top of the slice. In the first experiments, it can be helpful to add a fluorescent dye to the solution, in order to visualize the position of the pipette tip on the images that are acquired with the two-photon microscope (**Figure 3A**). In **Figure 3B**, it is visible that although the experimenter stopped the pipette descent as soon as its tip touched and deformed the slice surface on the bright-field image of the computer screen, its thin extremity entered slightly into the tissue, down to 80 - 100 μm from the surface. It is important that the pipette is not too superficial because it may not deliver the solution correctly onto the cells, nor enter too deep because it may reach a region where the fluorescence signal is too low. The parameters that may affect the depth reached by the pipette tip are the angle of the pipette, which can be adjusted with the three-axis micromanipulator, and the pipette mouth diameter.

Note that, with the projection along the Y-axis (**Figure 3B**), it is possible to observe that the fluorescence is stronger in the upper than in the lower part of the slice. This is due both to the progressive blunting of the signal inside the slice and to the fact that processes of microglia of the superficial layers of the slice, and some cell bodies, tend to migrate toward the surface. As a result, microglia in the most superficial layers of the slice might show a different morphology than those inside the slice, indicating that they are not in the same state, and may react differently to stimulation. Thus, superficial microglial activation may mask, in the z-projection, the response of the microglia below. In addition, the surface is often tilted, and the first z-images of the stacks are patchy. Therefore, we recommend, for a better accuracy, to exclude the most superficial z-planes from the z-projection and analysis. However, as altered microglia morphology and the presence of debris in the superficial layers are indicators of the condition of the slice, it can be interesting to image the full depth of a slice to check its status *a posteriori*. This can be especially useful to new experimenters who may not easily recognize abnormal microglia or debris from single z-planes. The z-planes taken in the first 30 μm will then be excluded at the z-projection step (step 5.1.2 of the protocol).

Once the slice has been treated with the compound of interest and recorded, the series of z-planes (excluding the first 30 μm , as discussed above) imaged at each time point are projected along the z-axis to make a 2D movie of z-projection images. To note is that in the protocol presented here, the thickness used for the max z-projection encompasses all the z-slices where fluorescence is visible (usually 180 - 220 μm , see step 5.1.2 of the protocol). Therefore, variations in the absolute number of z-slices do not impact the quantification of the response. In contrast, some studies use thinner z-stacks (40 - 60 μm) for z-projection^{6,7,11,27}. This is another option, which comes with the risk to exclude some z-slices which exhibit a response, as we observed that the attractant effect was visible as far as 70 μm (in z) away from the pipette tip in some experiments. If the thinner option is preferred, it is, thus, critical to center the z-stack on the pipette tip in z, and importantly, only z-projections done in the same manner (*i.e.*, using all fluorescent z-slices or using a thin z-stack) can be compared.

An R1 region of interest is then defined for quantitative analysis. **Figure 4** shows an ROI on a z-projection. The red dashed lines represent the putative position of the pipette. The yellow circle is R1, drawn with Icy, and centered on the putative tip of the pipette. Importantly, we observed that a noticeable variability arose during the quantification from the localization of the R1 ROI, whose misplacement leads to an underestimation of the response. To help positioning the ROI on the site of delivery, we recommend displaying the rulers in the acquisition software when positioning the pipette in the brightfield, in order to place the pipette tip always in the same central XY position in the field to be imaged. This provides an indication of where to position, later, the ROI in the Z-projection of the fluorescence images. However, the final tip position and, thus, the actual site of delivery will be slightly shifted from this central position, depending on the depth reached by the pipette tip. For this reason, to position R1, we take into consideration three other criteria: (i) R1 must be at the tip of the pipette, the position of which is inferred from the dark background in the lower right corner, (ii) it should correspond to the area where a transient distortion of the tissue occurs when the compound is injected, and (iii) it should correspond to the area where a local response (if any) is observed. If this is not sufficient to locate with good accuracy the point of delivery, filling the pipette with a fluorescent compound will help. After having drawn R1, we run the movie again to check that it is well positioned for all the time points and that there are no aberrant drift, distortion, or artifact fluorescence at any time point, which could bias the quantification. The movie corresponding to **Figure 4**, and illustrating the effect of ATP application, can be found in the supplemental material (**Movie S1**).

We initially studied the attraction of microglial processes toward ATP or 5-HT in the thalamus of P11 mice¹⁵. More recently, these experiments were repeated in slices from four-day- to two-month-old mice, and in various regions (for example, **Figure 3** corresponds to a recording in the hippocampus). We mostly used three- to four-week-old mice, which combines the advantages of having a mature brain with mature and ramified microglia with a good slice viability. Importantly, representative normal-state microglia are characterized by a small soma, long processes with small terminals, and constantly moving processes at the baseline condition. Typically, in slices from 18- to 30-day-old mice, the microglia morphology remains mostly unchanged for up to 6 h after the slice preparation. For slices from older mice (two months old), the ability to maintain the slices in a physiological state is reduced (~4 h). Examples of microglial direction motility in the thalamus, in response to 5-HT in a slice from a 20-day-old mouse and to ATP in a slice from a two-month-old mouse, are provided in **Figure 5**. The movie corresponding to the 5-HT application in **Figure 5** can be found in the supplemental material (**Movie S2**).

Figure 6 presents two suboptimal experiments made on slices kept for longer than 6 h in aCSF before they were imaged (only times 0 are shown). In **Figure 6A**, note the presence of microglia with multiple short processes or with enlarged terminals reminiscent of neurite growth cones, and the presence of many fluorescent cell debris or particles. These very fluorescent elements stay immobile or move randomly during imaging, indicating that they do not belong to "living" microglia (see **Movie S3** in the supplemental material). To note is that, in this particular example, microglia were constantly scanning their environment, but their morphology was so altered that they could not be considered as being in a physiological state. Moreover, the large amount of debris would have made the fluorescence analysis poorly reliable. **Figure 6B** illustrates the presence of microglia with large and flat cell bodies or protrusions, which can sometimes be found on the superficial layers of slices that have been kept several hours before they were imaged. Only superficial z-positions have been used to make this z-projection. **Figure 6C** is a substack, at deeper z-positions, from the same brain slice as shown in **Figure 6B**. Although they are not positioned at the surface, these microglia have an abnormal "bushy" aspect. Due to the aspect of microglia, the movies corresponding to these two slices were not used for quantification.

After extracting the data from the 2D-movies, the results can be represented by plotting normalized R(t) fluorescence over time. A graph summarizing several experiments is presented in **Figure 7A**, to show the variability of the responses. Note that the fluorescence decreases immediately but transiently (in the first three images) after the injection due to tissue distortion (*i.e.*, the liquid injection with the pipette transiently pushes the tissue away, and then increases). The variability in the response to ATP illustrates the fact that even when slices look similarly healthy, with motile and ramified microglia, they do not respond in the same manner (but all of them do respond). On top of intrinsic sample heterogeneity, there is some looseness in the R1 positioning, as mentioned above, and we also cannot exclude an impact of, for example, differences in the volume of the solution which is delivered. Therefore, to detect small effects or variations, it may be interesting to use an automatic device for the compound injection.

Figure 7B shows how the size of the ROI also impacts the quantification, here of the growth of ATP-induced processes. Increasing the diameter from 35 (the diameter used in **Figure 7A** and for all the analyses presented here) to 50 or 70 μm reduces the variability among experiments (slices) by suppressing the issue of the small R1 positioning. However, it also decreases accuracy and the magnitude of the detected response. Indeed, with larger ROIs, there is more background due to processes or cell bodies not affected by the treatment, and a growth of processes can be partially blunted by the concomitant retraction of microglial branches more distant from the pipette but nevertheless inside the ROI. In conclusion, it can be relevant to use ROIs with a different diameter circle than one that is 35 μm , but it is fundamental that the ROI is always the same in all the data sets to be compared.

Figure 7C shows the mean \pm SEM for several experiments with aCSF, ATP, or 5-HT. The effect of ATP is in the same range as those obtained by other groups with a similar method *in vivo* (0.5 according to Davalos *et al.*³ and 0.4 according to Haynes *et al.*¹³) and in slices (0.8 if normalized as is done here, according to Dissing-Olesen *et al.*⁵, and 0.6 according to Pagani *et al.*²⁸). On the one hand, differences can come from biological parameters, such as the slice preparation method, the amount of ATP injected, the age of the mouse, or the brain region used, and on the other hand from analysis parameters, such as the diameter of the ROI and the thickness of the z-stacks used for the z-projection (*i.e.*, the whole thickness where fluorescence is detected, or only the 40 - 60 μm around the pipette tip, where the maximal response is expected).

In **Figure 7C**, the aCSF injection is the negative control, necessary to check that the local injection and the pressure of the pipette do not cause an injury that may attract microglial processes. In addition, the aCSF control allows researchers to check that there is no photobleaching over time. Indeed, photobleaching, the photon-induced destruction of the fluorescent proteins or fluorophores, would have induced a progressive decrease of fluorescence over time. As it can bias measurements, it is important to rigorously check that there is no photobleaching in the experimental conditions. To do this, it is recommended to acquire an XYZT series on a slice with GFP-expressing microglia, for 30 min (aCSF can be injected but, actually, no stimulation is needed), with the excitation and acquisition parameters set as in the experimental conditions. Then, a quantitative measure of the fluorescence over time in different regions of interest, including microglia cell bodies or processes, will reveal if there is a gradual loss in emission intensity, usually an exponential decay, indicating photobleaching. If this is the case, some adjustments can be performed: a realignment of the laser, a reduction of the laser power and an increase of the detector gain, a reduction of the number of z-planes, and an increase of the interval between them to limit illumination. Photobleaching is favored by high-power or long (ex: repeated

illumination for line averaging) excitation; thus, researchers must pay attention to it if a sustained illumination is used to image cells with low fluorescence.

After the local injection of ATP or 5-HT, there is an increase of fluorescence in R1, which reaches a plateau (**Figure 7C**). In addition to kinetics, it can be interesting to compare the attraction at a stable endpoint. Here, we chose to represent the microglial response at $t = 26$ min (*i.e.*, 20 min after the injection) in **Figure 7D**. This is useful to statistically compare compounds, or to test the effect of antagonists which can be added in the bath (*i.e.*, in the perfusion solution, or together with the compound in the pipette [not shown]).

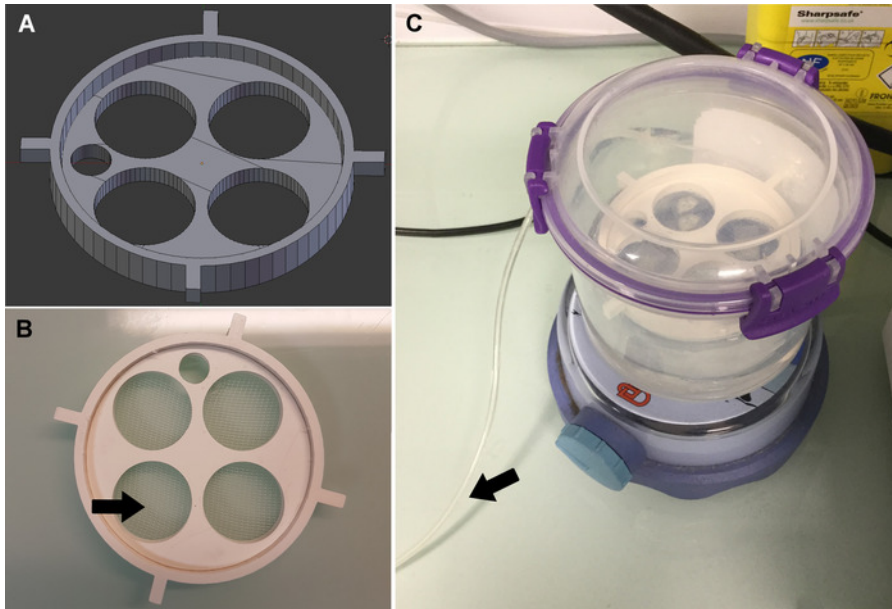


Figure 1: Interface chamber details. (A) Outline for the 3D printing of the slice holder. The external diameter of the holder is 7 cm. (B) Interface slice holder with the nylon mesh (arrow) that allows researchers to keep slices at the liquid-air interface. (C) Interface chamber device that makes it possible to maintain the slices in a carbogenated (the arrow indicates the tubing for bubbling) and humidified environment before they are imaged. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

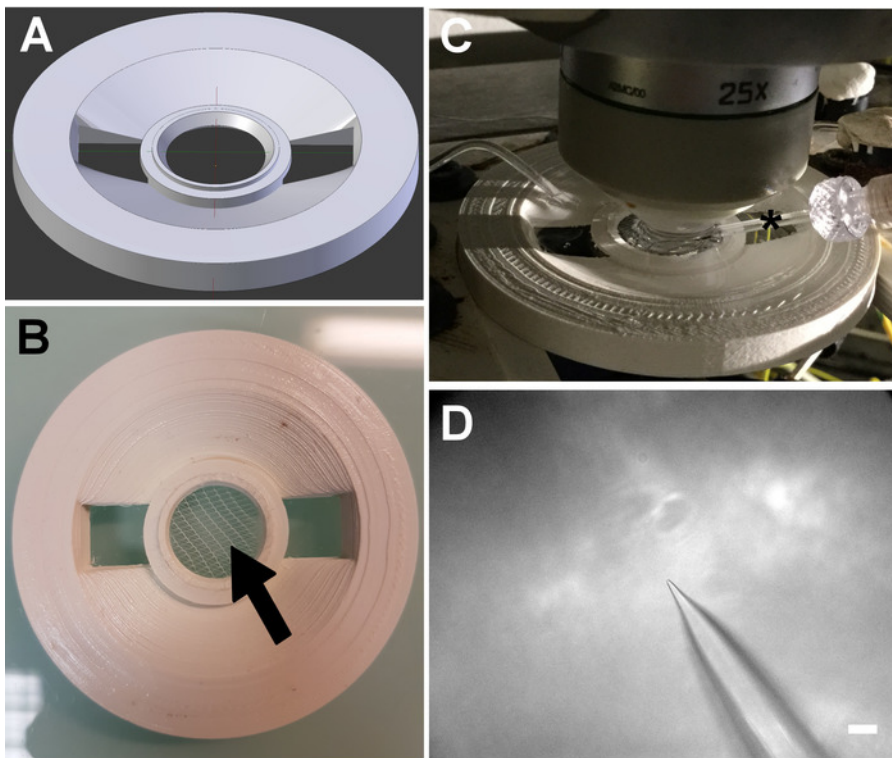


Figure 2: Perfusion chamber details. (A) Outline for the 3D printing. The external diameter of the perfusion chamber is 5.9 cm. (B) The perfusion chamber with the nylon mesh (arrow) that supports the slice, prevents it from touching the slide below, and allows the aCSF to flow above and under it. (C) Picture of the assembly at the two-photon microscope. The micropipette which will deliver the compound locally is visible on the right (asterisk). (D) Pipette imaged in brightfield. The scale bar = 60 μm . [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

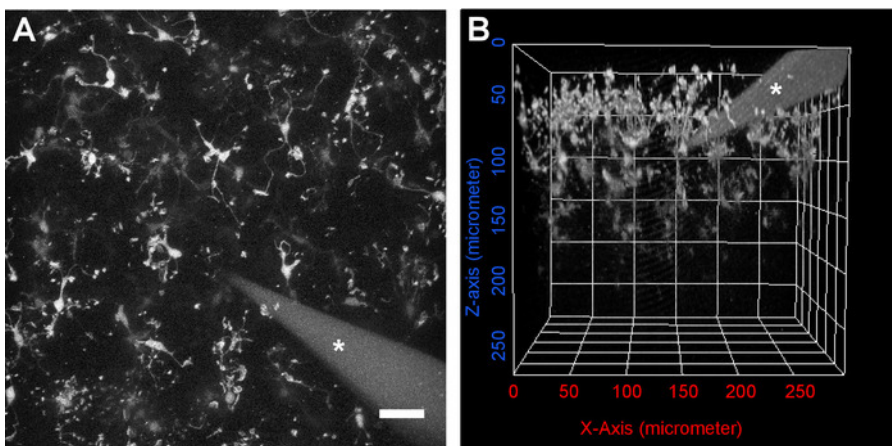


Figure 3: Position of the micropipette in the slice. Example of an acquisition of a stack of images (in the hippocampus of a 30-day-old animal) with a micropipette filled with fluorescein (1 μM). Fluorescein makes it possible to locate the pipette (asterisk) in the max projections along (A) the z-axis or (B) the y-axis. Note in panel B that, although fainter in fluorescence, there are also microglia below the pipette tip. In this illustrated example, the full stack, including the images taken in the most superficial part of the slice, has been used for the projections. The scale bar = 30 μm in panel A and as indicated (each graduation = 50 μm) in panel B. The z-thickness of the stack = 220 μm . [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

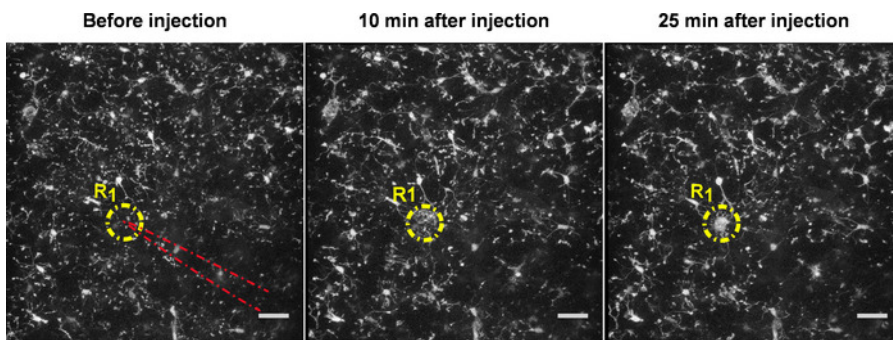


Figure 4: Positioning of R1, the ROI used for quantification. This figure shows three experimental time points of an experiment where ATP has been applied on a slice (from the thalamus of a 20-day-old animal), with drawings of the putative location of the pipette (red dashed line on the first time point) and the delineation of the R1 ROI. The scale bar = 30 μ m. Note the darker area in the lower right corner, corresponding to the shade of the pipette, which interferes with illumination and imaging. Note, also, the small region of intense fluorescence at 25 min, which indicates the location of the pipette tip. The z-thickness of the stack = 220 μ m. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

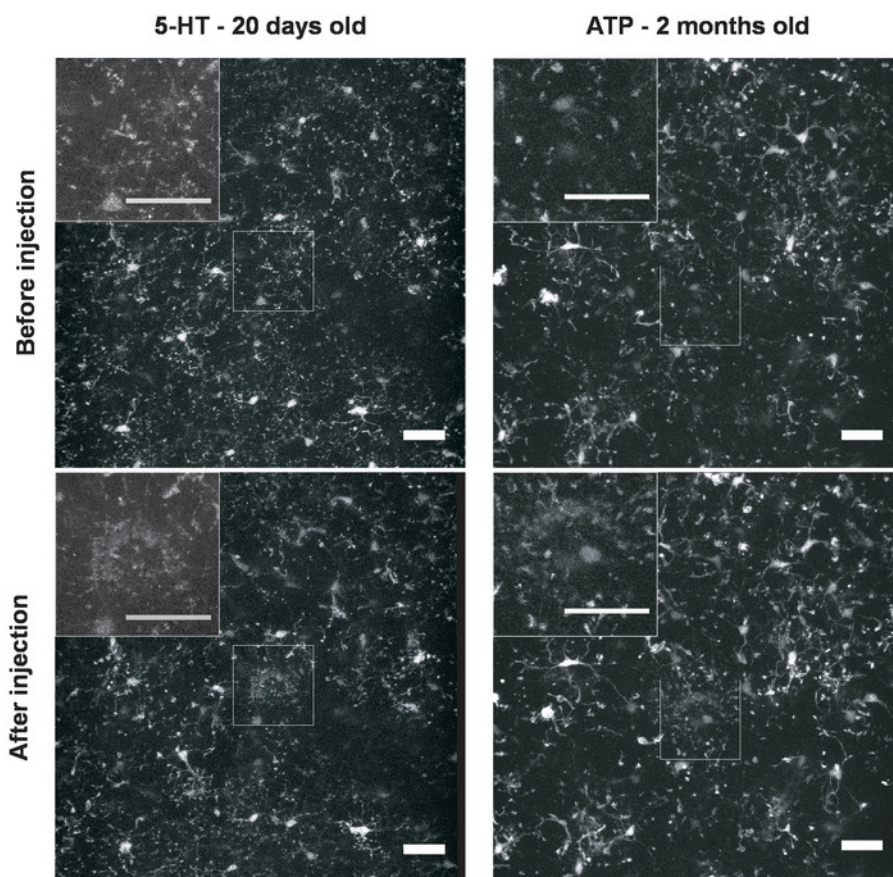


Figure 5: Microglial responses. Responses to the local application of 5-HT (5 μ M) on a brain slice from a 20-day-old mouse (left; the slice z-thickness = 220 μ m) and of ATP (500 μ M) on a slice from a two-month-old mouse (right; the slice z-thickness = 220 μ m). The red dashed lines represent the pipette position. Both recordings have been done in the thalamus, and the upper 30 μ m of the slices have been excluded. The images are taken before (upper row) and 25 min after (lower row) the injection. The scale bar = 30 μ m. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

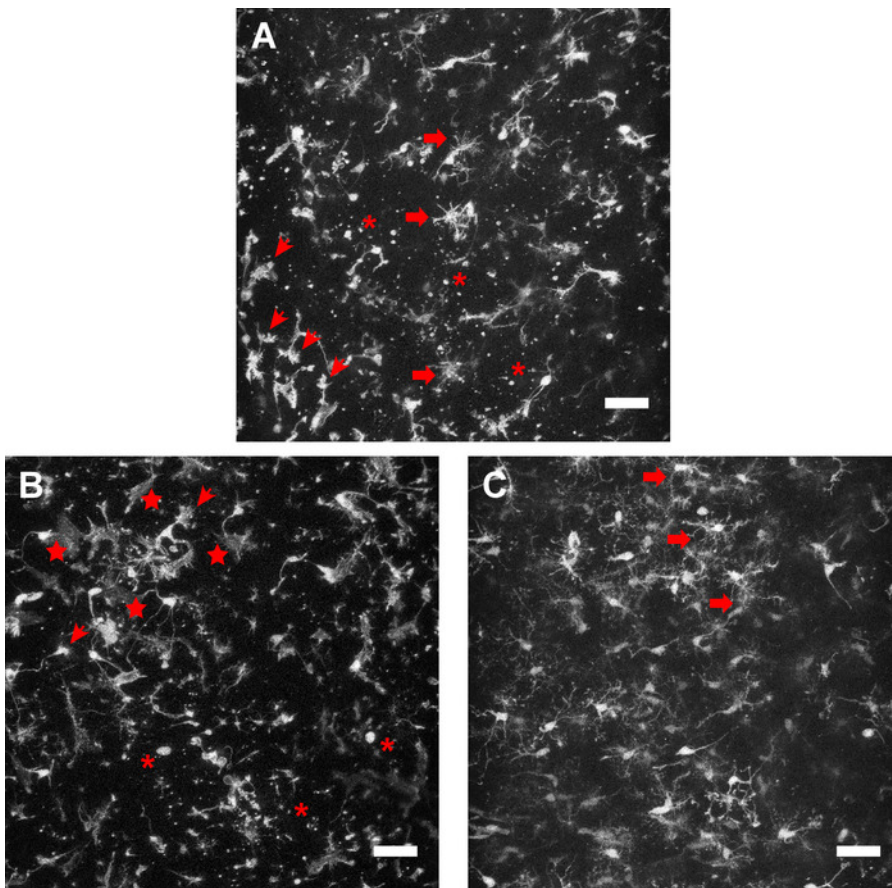


Figure 6: Examples of suboptimal experiments. These slices have waited for more than 6 h before imaging and have been imaged since their upper surface. (A) Example of a z-stack with a lot of debris (roughly round, fluorescent particles, but with irregular borders; asterisks) and "bushy" microglia (arrows), that is, with numerous but short processes. Note the enlarged process terminals (arrowheads) which look like axonal growth cones. The z-thickness of the stack = 220 μm . The other two panels show two sub-stacks of the same slice, with (B) 1-30 z-planes (z-thickness = 59 μm) and (C) 30-120 z-planes (z-thickness = 180 μm). On the top planes (shown in panel B), in addition to the large process terminals and debris like in panel A, there are microglia with unusual large flat bodies or protrusions (stars). On the deeper planes (shown in panel C), there is no debris nor flat objects, but the cells are bushy (arrows) and the density is unusually high. Altogether, these observations indicate that the microglia are not in a normal state. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

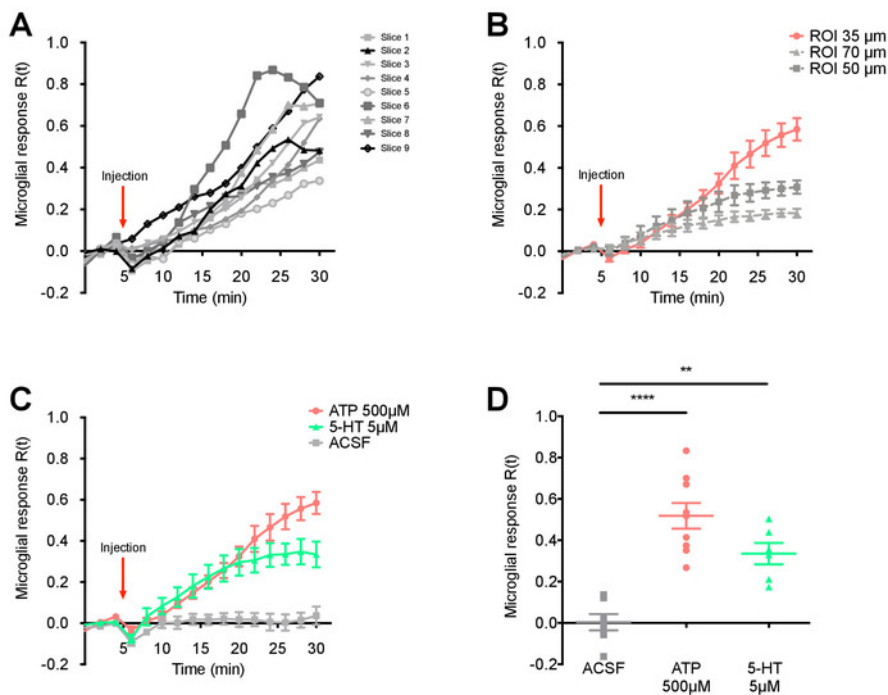
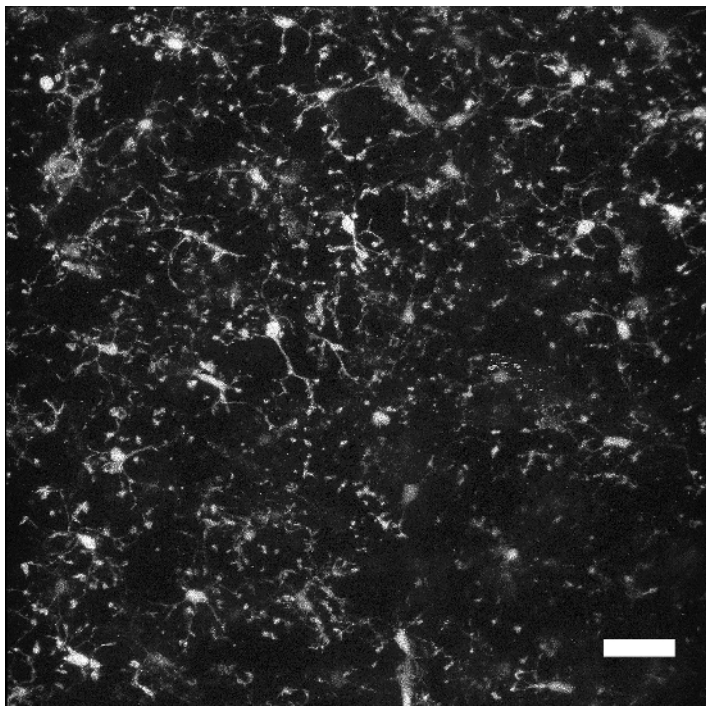
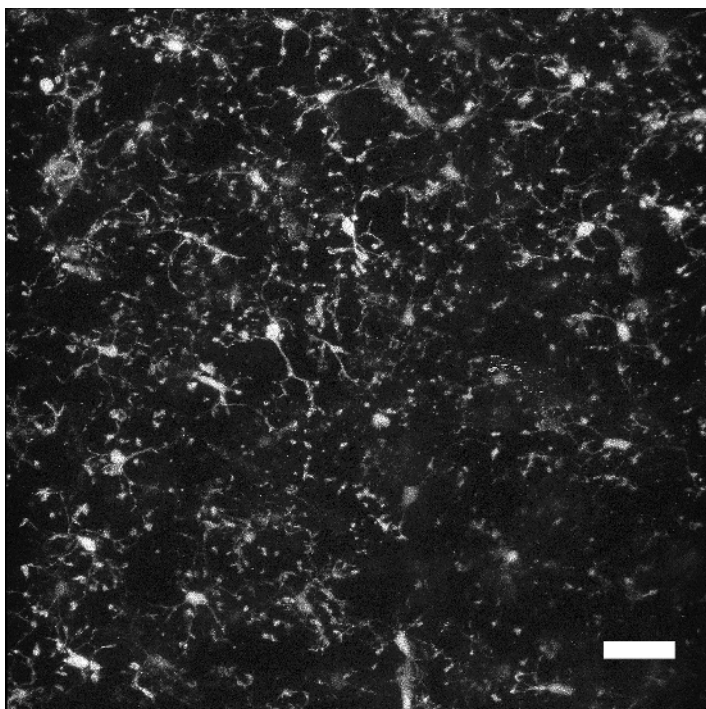


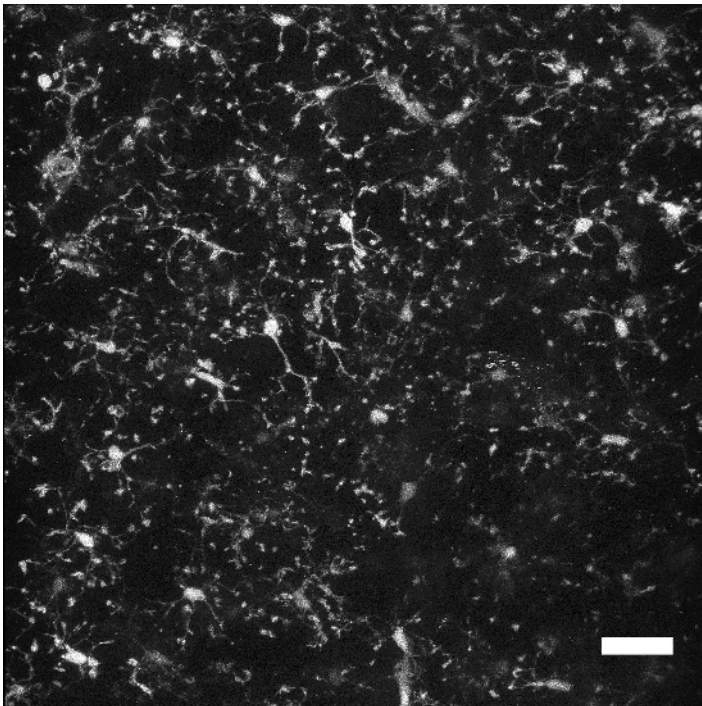
Figure 7: Quantification of the attraction of microglial processes. (A) Example of a series of experiments with ATP to illustrate variability. (B) Impact of the ROI size on the quantification. Each experiment shown in panel A (ATP injection) has been analyzed with an ROI of 35, 50, or 70 μm diameter. The mean ± SEM of the fluorescence at each time point is shown for the different ROIs. (C) Summary of experiments with aCSF, 5-HT, and ATP. The aCSF injection has no effect on the location of microglial processes. ATP and 5-HT induce a localized growth of microglial processes toward the pipette, measured with the local increase of fluorescence. The mean ± SEM are indicated. (D) Summary of microglial responses at $t = 20$ min postinjection (26 min from the beginning of recording). The mean ± SEM are indicated. One-way ANOVA with Dunnett *post hoc* test is used. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to the aCSF injection. For aCSF, $n = 7$; for ATP, $n = 8$; for 5-HT, $n = 6$. All these experiments were performed in the thalamus, but similar results can be obtained from the hippocampus or cortex. The z-thickness of the stacks used for z-projections and quantification = 180 - 220 μm. All measures except those in panel B have been done with a 35 μm-diameter ROI. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



Movie S1: Example of the effect of a local ATP (500 μM) application. This experiment has been performed in the thalamus of a 20-day-old animal. Images from this movie have been used for **Figure 4**. The scale bar = 30 μm . [Please click here to view this video.](#) (Right-click to download.)



Movie S2: Example of the effect of a local 5-HT (5 μM) application. This experiment has been performed in the thalamus of a 20-day-old animal. Images from this movie have been used for **Figure 5** (left). The scale bar = 30 μm . [Please click here to view this video.](#) (Right-click to download.)



Movie S3: Example of a suboptimal experiment in a slice having waited for more than 6 h before imaging. Note the presence of numerous debris which moves randomly over time and the unusual morphology of the microglia. An image from this movie is used as **Figure 6A**. The scale bar = 30 μm . [Please click here to view this video.](#) ([Right-click to download.](#))

Supplementary File. Imaging chamber and Interface holding chamber. [Please click here to download this file.](#)

Discussion

By maintaining, unlike in dissociated or organotypic slice culture, a structural integrity with limited network adjustments, acute brain slices allow researchers to study microglia in their physiological environment. However, one of the major limitations is the fact that the slicing procedure creates injuries that can rapidly compromise the viability of neurons, particularly in the adult brain. As microglia are particularly reactive to cell damage, it is important to limit neuronal cell death as much as possible to preserve microglia close to their physiological state. This, in turn, contributes *via* a virtuous circle to a better general condition of the slice.

The protocol described in this article applies several improvements found in the literature for electrophysiology experiments, aimed at obtaining a better viability of the slices over several hours, especially from adult mice. To overcome the age-related disparity in slice viability, we substituted sodium with choline and used this choline-aCSF medium during the cardiac perfusion, slicing, and recovery phases. This brings the cell excitotoxicity to a minimum^{29,30}. It should be noted that, in addition to choline-aCSF, there are many other alternative aCSF recipes that are highly effective for neuronal preservation, like N-methyl-D-glucamine (NMDG)-aCSF³¹, which could also be interesting for microglial studies but have not been tested here. Another critical step in this procedure is the cardiac perfusion. By perfusing the animal with a cold choline-aCSF solution, containing low Na^+ , low Ca^{2+} , and high Mg^{2+} , a rapid decrease in body temperature is induced and the metabolic activity of the cells in the brain is lowered, thereby reducing the cellular stress caused by the cutting. Indeed, we observed that this approach offered more protection than simply removing the whole brain and submerging it in aCSF solution. Inspired by a protocol optimized for patch-clamp and optogenetic studies²⁹, we also used a "protective recovery" period immediately following the physical slicing, allowing the slices to recover from the trauma of slicing for 10 min in choline-aCSF at 32 °C. Afterward, slices were transferred into the interface holding chamber to recover for an additional minimum time of 30 min. The duration of this second recovery period could be optimized according to the brain area of interest, the Na^+ substitute, and the age of the animal, and it should last at least 1 h if electrophysiology has to be performed in parallel with imaging.

The maintenance of the slice in a healthy state before use and the perfusion during imaging are also important parameters. Both the interface and the dual-perfusion chamber are widely established tools in electrophysiology. For example, the interface method has been used to improve the viability of hippocampal slices since 1995²⁶. Devices similar to the chambers used here are proposed by several companies but not yet commonly used for microglia imaging. We designed an interface holding chamber, where the slices lay on a net and are on the interface with a large reservoir of aCSF, delaying the cellular deterioration of the slices during prolonged incubation times. In the imaging chamber, we used a designed double-sided perfusion chamber which allows increased oxygenation of acute slice preparations, maintaining the cells in a healthy state during multiphoton microscopy. In contrast with the single perfusion, the double perfusion of submerged slices increases the viability of the cells, since oxygen, as well as other materials, can freely and effectively diffuse with a high flow rate from both sides of considerably thick slices.

This protocol is aimed at quantifying the global attractant effect of ATP or other compounds on microglial processes, and its quantification method is based on the one used in Davalos *et al.*³. It is possible to perform other kinds of analysis. For example, an alternative method, which does not depend on the fluorescence level of the microglial processes but requires more actions of the experimenter for the image analysis, is to

measure the reduction of the empty space around the pipette tip after compound application^{11,32}. It is also possible to track the movement of the tip of individual microglial processes^{15,28}.

In addition, the isotropic motility or surveillance of microglia can also be registered in basal condition or upon the bath application of compounds of interest on the slices prepared with this protocol. However, to quantify the fast extension and retraction rates of microglial processes and detect potential variations, it would be relevant to increase the acquisition frequency. For example, Pagani *et al.* use a frequency of one image every 10 s²⁸.

Finally, recent publications described methods to quantify morphological changes or the motility of individual processes in three dimensions. For such analyses, although a z-step interval of 2 μm is enough for some programs²⁷, others require a better axial resolution (*i.e.*, a z-step of 0.4 μm according to Heindl *et al.*³³).

Here, we showed experiments on wild-type mice with an endogenous expression of GFP in microglia and with a mechanical application of compounds, but this protocol can be adapted to other fluorescent reporter proteins in microglia, like YFP¹⁸, or to the exogenous labeling of microglia with fluorescent isolectin^{11,34}. Finally, we have studied the outgrowth of microglial processes toward a local application of ATP or 5-HT in a wild-type normal environment, but this protocol could be used to test other compounds, other kinds of stimulation (*e.g.*, caged compounds), and to test how directional motility is affected by mutations, pharmacological agents, or pathological contexts.

Disclosures

The authors have nothing to disclose.

Acknowledgements

This work has been supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Sorbonne Université Sciences, and by grants from Sorbonne Universités-Pierre et Marie Curie University (Emergence-UPMC program 2011/2014), the Fondation pour la Recherche sur le Cerveau, the Fondation de France, the Fondation pour la Recherche Médicale "Equipe FRM DEQ2014039529", the French Ministry of Research (Agence Nationale pour la Recherche ANR-17-CE16-0008 and the Investissements d'Avenir programme "Bio-Psy Labex" ANR-11-IDEX-0004-02) and a Collaborative Research in Computational Neuroscience program, National Science Foundation/French National Agency for Research (number : 1515686). All the authors are affiliated to research groups which are members of the Paris School of Neuroscience (ENP) and of the Bio-Psy Labex. F.E. is a Ph.D. student affiliated with Sorbonne Université, Collège Doctoral, F-75005 Paris, France, and is funded by the Bio-Psy Labex. V.M. is a post-doctoral fellow funded by the Collaborative Research in Computational Neuroscience program, National Science Foundation/French National Agency for Research (number: 1515686). The authors thank Marta Kolodziejczak who participated in the initiation of the project.

References

1. Salter, M. W., Stevens, B. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nature Publishing Group*. **23** (9), 1018-1027 (2017).
2. Tay, T. L., Savage, J., Hui, C. W., Bisht, K., Tremblay, M.-É. Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition. *The Journal of Physiology*. (2016).
3. Davalos, D. *et al.* ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. *Nature Neuroscience*. **8** (6), 752-758 (2005).
4. Nimmerjahn, A. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma *in Vivo*. *Science*. **308** (5726), 1314-1318 (2005).
5. Dissing-Olesen, L. *et al.* Activation of neuronal NMDA receptors triggers transient ATP-mediated microglial process outgrowth. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. **34** (32), 10511-10527 (2014).
6. Gyoneva, S., Traynelis, S. F. Norepinephrine modulates the motility of resting and activated microglia *via* different adrenergic receptors. *Journal of Biological Chemistry*. **288** (21), 15291-15302 (2013).
7. Eyo, U. B. *et al.* Neuronal hyperactivity recruits microglial processes *via* neuronal NMDA receptors and microglial P2Y12 receptors after status epilepticus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. **34** (32), 10528-10540 (2014).
8. Hristovska, I., Pascual, O. Deciphering Resting Microglial Morphology and Process Motility from a Synaptic Prospect. *Frontiers in Integrative Neuroscience*. **9**, 1231 (2016).
9. Avignone, E., Lepleux, M., Angibaud, J., Nägerl, U. V. Altered morphological dynamics of activated microglia after induction of status epilepticus. *Journal of Neuroinflammation*. **12**, 202 (2015).
10. Abiega, O. *et al.* Neuronal Hyperactivity Disturbs ATP Microgradients, Impairs Microglial Motility, and Reduces Phagocytic Receptor Expression Triggering Apoptosis/Microglial Phagocytosis Uncoupling. *PLoS Biology*. **14** (5), e1002466 (2016).
11. Madry, C. *et al.* Microglial Ramification, Surveillance, and Interleukin-1 β Release Are Regulated by the Two-Pore Domain K⁺Channel THIK-1. *Neuron*. **97** (2), 299-312.e6 (2018).
12. Honda, S. *et al.* Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. **21** (6), 1975-1982 (2001).
13. Haynes, S. E. *et al.* The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nature Neuroscience*. **9** (12), 1512-1519 (2006).
14. Wu, L.-J., Vadakkan, K. I., Zhuo, M. ATP-induced chemotaxis of microglial processes requires P2Y receptor-activated initiation of outward potassium currents. *Glia*. **55** (8), 810-821 (2007).
15. Kolodziejczak, M. *et al.* Serotonin Modulates Developmental Microglia *via* 5-HT 2B Receptors: Potential Implication during Synaptic Refinement of Retinogeniculate Projections. *ACS Chemical Neuroscience*. **6** (7), 1219-1230 (2015).
16. Schafer, D. P. *et al.* Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron*. **74** (4), 691-705 (2012).

17. Pfeiffer, T., Avignone, E., Nägerl, U. V. Induction of hippocampal long-term potentiation increases the morphological dynamics of microglial processes and prolongs their contacts with dendritic spines. *Scientific Reports*. **6**, 32422 (2016).
18. Parkhurst, C. N. *et al.* Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell*. **155** (7), 1596-1609 (2013).
19. Wu, Y., Dissing-Olesen, L., Macvicar, B. A., Stevens, B. Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends in Immunology*. **36** (10), 605-613 (2015).
20. Ohsawa, K. *et al.* P2Y12 receptor-mediated integrin-beta1 activation regulates microglial process extension induced by ATP. *Glia*. **58** (7), 790-801 (2010).
21. Kurpius, D., Wilson, N., Fuller, L., Hoffman, A., Dailey, M. E. Early activation, motility, and homing of neonatal microglia to injured neurons does not require protein synthesis. *Glia*. **54** (1), 58-70 (2006).
22. Stence, N., Waite, M., Dailey, M. E. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*. **33** (3), 256-266 (2001).
23. Dissing-Olesen, L., Macvicar, B. A. Fixation and Immunolabeling of Brain Slices: SNAPSHOT Method. *Current Protocols in Neuroscience*. **71**, 1.23.1-12 (2015).
24. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. **9** (7), 676-682 (2012).
25. de Chaumont, F. *et al.* Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nature Methods*. **9** (7), 690-696 (2012).
26. Aitken, P. G. *et al.* Preparative methods for brain slices: a discussion. *Journal of Neuroscience Methods*. **59** (1), 139-149 (1995).
27. Paris, I. *et al.* ProMolJ: A new tool for automatic three-dimensional analysis of microglial process motility. *Glia*. **66** (4), 828-845 (2018).
28. Pagani, F. *et al.* Defective microglial development in the hippocampus of Cx3cr1 deficient mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. **9** (229), 111 (2015).
29. Ting, J. T., Daigle, T. L., Chen, Q., Feng, G. Acute brain slice methods for adult and aging animals: application of targeted patch clamp analysis and optogenetics. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ). **1183**, 221-242 (2014).
30. Mainen, Z. F. *et al.* Two-photon imaging in living brain slices. *Methods*. (San Diego, CA). **18** (2), 231-239, 181 (1999).
31. Tanaka, Y., Tanaka, Y., Furuta, T., Yanagawa, Y., Kaneko, T. The effects of cutting solutions on the viability of GABAergic interneurons in cerebral cortical slices of adult mice. *Journal of Neuroscience Methods*. **171** (1), 118-125 (2008).
32. Gyoneva, S. *et al.* Systemic inflammation regulates microglial responses to tissue damage *in vivo*. *Glia*. **62** (8), 1345-1360 (2014).
33. Heindl, S. *et al.* Automated Morphological Analysis of Microglia After Stroke. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. **12**, 106 (2018).
34. Dailey, M. E., Eyo, U., Fuller, L., Hass, J., Kurpius, D. Imaging microglia in brain slices and slice cultures. *Cold Spring Harbor Protocols*. **2013** (12), 1142-1148 (2013).

II - Rôle du R-5-HT2B microglial dans la croissance orientée des prolongements microgliaux

Les récepteurs microgliaux 5-HT2B et P2Y12 sont tous les deux nécessaires à l'attraction des prolongements microgliaux vers la 5-HT

Article en préparation

1. Objectifs

Les microglies sont des cellules dynamiques grâce à leur morphologie hautement ramifiée jouant d'important rôles dans le système nerveux central (SNC). En effet, leurs prolongements sont constamment en mouvements par des phénomènes d'extension et de rétraction (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). Ce phénomène est plus connu sous le nom de surveillance microgliale permettant à ces cellules de surveiller leur environnement aussi bien en conditions physiologiques que pathologiques. En scannant leur environnement, les microglies interagissent avec les autres cellules du SNC telles que les neurones permettant de moduler l'élagage synaptique (Hong et al., 2016; Paolicelli et al., 2011; Schafer et al., 2012) ainsi que la plasticité synaptique en favorisant la formation ou l'élimination des synapses (Miyamoto et al., 2016; Tremblay et al., 2010). Les microglies sont capables d'étendre et de projeter leurs prolongements vers une lésion ou vers des débris cellulaires, phénomène principalement médié par la libération d'ATP (Davalos et al., 2005; Dissing-Olesen et al., 2014; Nimmerjahn et al., 2005) (Haynes et al., 2006; Ohsawa et al., 2010). De récentes études du laboratoire ont montré qu'une application locale de sérotonine induisait une attraction des prolongements microgliaux, et cette réponse est dépendante du récepteur 5-HT2B. Il s'agit du principal récepteur à la sérotonine exprimé par les microglies (Kolodziejczak et al., 2015), mais il est également exprimé par les neurones sérotoninergiques et quelques neurones dopaminergiques (Diaz et al., 2012).

A partir de ces résultats, nous avons essayé de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la motilité directionnelle des prolongements microgliaux à la 5-HT et de déterminer si l'activation du récepteur 5-HT2B microglial est suffisante pour induire ce phénomène. Pour ce faire, nous avons utilisé des lignées de souris transgéniques différentes : des souris ayant une délétion totale du récepteur 5-HT2B et des souris ayant une délétion conditionnelle du récepteur 5-HT2B dans les microglies uniquement. Le génotype des différentes souris utilisées sont décrites dans le tableau suivant.

<i>Génotypes souris</i>	<i>Traitement</i>	<i>Objectifs utilisation</i>
Cx3cr1 ^{GFP/+}	/	Motilité prolongements des microglies WT
Cx3cr1 ^{GFP/+} ; Htr2b ^{-/-}	/	Motilité prolongements des microglies, <i>Htr2b</i> délétion totale (KO)
Cx3cr1 ^{CreERT2/+} ; Htr2b ^{+/+} ; RCE/RCE	Tamoxifène	Motilité prolongements des microglies, délétion conditionnelle sauvage (cWT)
Cx3cr1 ^{CreERT2/+} ; Htr2b ^{fl/fl} ; RCE/RCE	Tamoxifène	Motilité prolongements des microglies, <i>Htr2b</i> délétion conditionnelle (cKO)
Pet1 ^{Cre/+} ; Cx3cr1 ^{GFP/+}	Injection stéréotaxique	Interaction microglies – neurones sérotoninergiques

Dans toutes ces lignées, les microglies sont visibles en imagerie grâce à l'expression d'une protéine fluorescence spécifiquement dans ces cellules. Elles expriment soit la GFP sous le contrôle du promoteur Cx3cr1, soit la YFP sous *via* la Cre recombinase (souris Cx3cr1^{CreERT2/+}). Cependant, l'intensité de fluorescence de la YFP n'était pas suffisamment forte pour imager en détails les microglies. J'ai donc créé des souris triple transgéniques en leur ajoutant un allèle RCE. Il s'agit d'un allèle rapporteur correspondant à l'insertion dans le locus Rosa26 d'une cassette « loxP-Stop-loxP » en amont du gène de la protéine fluorescente verte renforcée (EGFP). Ainsi, après le traitement au tamoxifène des souris Cx3cr1^{CreERT2/+} ; Htr2b^{+/+} ; RCE/RCE et Cx3cr1^{CreERT2/+} ; Htr2b^{fl/fl} ; RCE/RCE on obtient des microglies exprimant la EGFP en plus de la YFP initialement présente.

2. Résultats principaux

Dans cette étude nous avons pu déterminer le mécanisme impliqué dans l'attraction des prolongements des microglies vers une application locale de 5-HT ainsi que le rôle du récepteur 5-HT2B dans la motilité des cellules microgliales.

- Le récepteur 5-HT2B microgliale est nécessaire à l'attraction des prolongements des microglies à une application locale de 5-HT
- Ce récepteur n'est pas impliqué dans la surveillance microgliale
- Un gradient d'ATP/ADP extracellulaire et le récepteur P2Y12 sont nécessaires pour la réponse microgliale à la 5-HT
- Les microglies contactent les fibres sérotoninergiques de manière spontanée sur des tranches aigües de cerveau de souris

3. Conclusions

Cette étude nous a permis d'élucider le mécanisme d'action de la sérotonine sur la motilité des prolongements microgliaux. Appliquée localement, la sérotonine induit une croissance orientée des prolongements microgliaux dépendant du récepteur microgliale 5-HT2B mais également du récepteur P2Y12 *via* un gradient extracellulaire d'ATP/ADP. Des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de savoir si ce gradient extracellulaire est directement libéré par les cellules microgliales ou s'il est amplifié par les astrocytes à proximité. Pour finir, les cellules microgliales contactent spontanément les neurones sérotoninergiques au cours du temps.

4. Contribution personnelle

Dans cette étude j'ai réalisé le suivi des souris des différentes lignées (accouplements, génotypages et traitement au tamoxifène à la naissance), la préparation des tranches aigües de cerveau de souris ainsi que les acquisitions par microscopie bi-photonique (attraction des prolongements microglies, surveillance microgliale et interaction entre microglies et fibres sérotoninergiques). J'ai également effectué les injections stéréotaxiques de virus chez la souris ainsi que les analyses des acquisitions faites par imagerie bi-photonique selon la méthode expliqué dans (Etienne et al., 2019).

Microglial 5-HT_{2B} receptor and purinergic signaling are both required for microglial processes attraction toward serotonin

Fanny Etienne^{1,2,3}, Giulia Albertini^{1,2,3}, Ivana D'Andrea^{1,2,3}, Amina Benhadda^{1,2,3}, Nicolas Gervasi^{1,2,3}, Luc Maroteaux^{1,2,3}, and Anne Roumier^{1,2,3}

¹INSERM UMR-S1270, F-75005, Paris, France

²Sorbonne Université, F-75005, Paris

³Institut du Fer à Moulin, F-75005, Paris

· **Corresponding author:** Anne Roumier ; INSERM UMR-S1270, 17 rue du Fer à Moulin, Paris, 75005, France ; Phone 33 1 45 87 61 24 ; Email : anne.roumier@inserm.fr

Abstract

The brain resident macrophages, microglia, have a highly branched morphology and constantly extend and retract their processes in physiological conditions in order to survey their environment. Microglia are able to modulate synaptic plasticity as well as neonatal synaptic pruning. Although microglia are known to extend directionally their processes in response to tissue damage through activation of P2Y₁₂ receptors by ATP released by damage sites, other neuromodulators have the capacity to impact on microglial processes motility. We previously reported that the 5-HT_{2B} receptor is the main serotonin (5-HT) receptor expressed by microglia and is required for microglial processes outgrowth toward a local application of 5-HT. The mechanism and signaling pathway involved in microglial response toward 5-HT is not known yet. In this work, using two-photon microscopy on acute brain slices from transgenic mice and pharmacological tools, we demonstrated the direct implication of the 5-HT_{2B} receptors expressed by microglia, and uncovered that purinergic signaling is also required for microglial processes extension toward 5-HT. In addition, by using viral conditional expression, we were able to visualize spontaneous contacts between microglial processes and serotonergic neuron fibers. Together, these results demonstrate that 5-HT is able to induce microglia processes directional motility in a P2Y₁₂ receptor-dependent manner.

Introduction

Since the two last decades, it has been described that microglia, the brain resident macrophages, never rest and constantly extending and retracting their processes in order to survey their environment (Nimmerjahn et al., 2005). Microglia have a highly branched morphology with long and fine constantly moving processes. This microglial processes motility, commonly named “surveillance”, is a crucial property of microglia in the central nervous system (CNS). Indeed, the capacity of microglial processes to survey their environment allows to detect any brain homeostasis disruptions. They respond to these disruptions by releasing soluble factors as cytokines (Hanisch and Kettenmann, 2007) and phagocytosing apoptotic cells and debris (Petersen and Dailey, 2004). The motility is also required for microglia to perform several important functions in the CNS, in both physiological and pathological conditions. Indeed, the dynamic interaction of microglia with neurons allows them to modulate synaptic plasticity (Wake et al., 2009; Tremblay et al., 2010; Li et al., 2012; Schafer et al., 2012) as well as neonatal synaptic pruning (Paolicelli et al., 2011). In contrast to this surveillance in all directions, microglia can also extend their processes towards sites of tissue damage. This directional motility is triggered by extracellular ATP released by damage sites or its down-product ADP, and is P2Y₁₂ receptor-dependent (Haynes et al., 2006).

In a previous study, we observed by immunostaining very close contacts between microglia and serotonergic varicosities in the brain (Kolodziejczak et al., 2015), suggesting that 5-HT may also attract microglial processes, and indeed we showed in acute brain slices from, a directional motility of microglial processes toward a local application of 5-HT (Kolodziejczak et al., 2015). This was prevented by an antagonist of 5-HT_{2B}R, the main 5-HT receptor expressed by microglia (Kolodziejczak et al., 2015) Krabbe et al., 2012), but which is also expressed in some serotonergic and dopaminergic neurons (Diaz et al., 2012; Doly et al., 2017).

Unlike the role of ATP on microglial processes attraction, well described in the literature (Davalos et al., 2005), the mechanism and signaling pathway involved in microglial response toward 5-HT is not known yet. In this work, we studied the effect of 5-HT on microglia directional motility by using two-photon microscopy on acute brain slices from transgenic mice, and assessed the contribution of the microglial 5-HT_{2B} receptor. By using a pharmacological approach, we demonstrated that the purinergic signaling pathway is also required for microglial processes attraction toward 5-HT. Indeed, extracellular ATP or ADP is necessary to induce P2Y₁₂ receptor activation. In addition, by using viral conditional expression, we were able to visualize spontaneous contacts between microglial processes and serotonergic neuron fibers. Together, these results demonstrate that 5-HT is able to regulate microglia processes motility.

Materials and methods

Animals

Htr2b mice

Knockout mice, *129S2.Cg-Htr2b^{tm1Lum}/Htr2b^{tm1Lum}* (*Htr2b^{-/-}*) were generated on the 129S2/SvPas strain.

Cx3cr1^{GFP} mice (Jung et al., 2000) were backcrossed on 129S2 background for more than 10 generations. Both lines were crossed to obtain *Cx3cr1^{GFP/+}; Htr2b^{-/-}* and *Cx3cr1^{GFP/+}; Htr2^{+/+}* mice.

Cx3Cr1CreERT2 Htr2b flox RCE mice

Htr2b^{fl/fl}, the *Htr2b* floxed mice (*Htr2b^{tm2Lum} / Htr2b^{tm2Lum}*), were generated as described (Doly et al., 2017; Belmer et al., 2018) with backcrossing on 129S2 background for more than 10 generations. *Cx3cr1^{CreER}* mice, which express tamoxifen-inducible Cre recombinase in microglia under the control of the endogenous *Cx3cr1* promoter, have been previously described (Parkhurst et al., 2013) and were backcrossed on 129S2 background with *Htr2b^{fl/fl}* for more than 10 generations. Along the procedure, only *Cx3cr1^{CreER/+}* males were used for breeding. Then, *129S2.Cg-Tg(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-EGFP)Fsh}* (Rosa26;CAG-loxP-STOP-loxP-EGFP or RCE) were crossed with *Cx3cr1^{CreER} ; Htr2b^{fl/fl}* mice generating *Cx3cr1^{CreER/+}; Htr2b^{fl/fl}*; *RCE/RCE* mice that express GFP in microglia only after tamoxifen-induced recombination.

Pet1Cre Htr2b flox RCE mice

The *Htr2b^{lox/lox}* mice were inactivated for *Htr2b* in 5-HT neurons by crossing with *129S2.Cg-Tg(Fev-cre)^{1Esd/0}* (e*Pet1-Cre* BAC transgenic mice or *Pet1-Cre^{+/0}*) (Scott et al., 2005a; Scott et al., 2005b) generating *129S2.Cg-Pet1-Cre^{+/0}; Htr2b^{lox}/Htr2b^{lox}* conditional knockout mice (*Htr2b^{5-HTKO}*) and littermate controls (*Htr2b^{lox/lox}*). Then, *129S2.Cg-Tg(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-EGFP)Fsh}* (Rosa26;CAG-loxP-STOP-loxP-EGFP or RCE) were crossed with *Pet1-Cre^{+/0}* generating (*Pet1-GFP*) that express GFP in *Pet1* positive 5-HT neurons only after Cre recombination.

All the experiments presented in the study have been performed on young adult mice (18-60 days old). Temperature was maintained at 21 ± 1 °C, under 12/12h light/dark. All mice were bred in our animal facility. Food and water were available *ad libitum*. Animal care were conducted in accordance with the standard ethical guidelines (National Institutes of Health's Guide for the care and use of Laboratory animals' and European Directive 2010/63/UE). All experiments involving with mice were approved by our local ethical committee (Darwin Committee, agreement (N° 1170.02).

Tamoxifen treatment

Tamoxifen (Sigma Aldrich) was given as a solution in corn oil (Sigma-Aldrich) to neonatal animals as described in (Pitulescu et al., 2010). Briefly, neonatal animals were given 50 µg tamoxifen per day for 3 consecutive days between P0 and P5 via intragastric administration to induce the Cre-mediated recombination.

Brain slice preparation

Acute brain slices were prepared as described in (Etienne et al., 2019). Briefly, mice were decapitated, their brain removed, and coronal brain slices (300 µm thickness) were obtained. Slices were prepared in an ice-cold solution of the following composition (in mM): choline Cl 110; glucose 25; NaHCO₃ 25; MgCl₂ 7; ascorbic acid 11.6; Na⁺-pyruvate 3.1; KCl 2.5; NaH₂PO₄ 1.25; and CaCl₂ 0.5 saturated with 5% CO₂/95% O₂. Slices were stored at room temperature in 95% O₂/5% CO₂- equilibrated artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing the following (in mM): NaCl 124; NaHCO₃ 26.2; glucose 11; KCl 2.5; CaCl₂ 2.5; MgCl₂ 1.3; and NaH₂PO₄ 1.

Two-Photon Imaging

Microglia were imaged as described in (Etienne et al., 2019), in the thalamus. Briefly, acquisitions are made at a depth of ~ 50 µm in the slice to avoid studying superficial microglia that had started to become activated by the slicing procedure. For imaging of microglia labeled with eGFP, the laser was tuned to a wavelength of 920 nm. Stacks of slices were imaged at 2 µm of depth interval every 2 min for directional motility experiments, every minute for surveillance experiments, and every 30 seconds for microglia-serotonergic neuron fibers interactions. Images were 1024 x 1024 pixels and covered a square field of view 295 µm wide.

Local applications of compounds were performed with a glass pipette filled with aCSF, 500 µM ATP, 5 µM 5-HT or antagonists. For bath application, ATP 500 µM or 5-HT 5 µM were diluted in 50 mL of aCSF and, after 10 min of baseline recording, perfused onto the slice

Image Analysis

Analysis of two-photon images were performed with ImageJ and Icy.

Analysis of directed microglia processes. According to (Etienne et al., 2019) we performed a maximum intensity projection and registered the resulting two-dimensional movies. A region of interest R1 of 35 µm in diameter was draw and centered to the injection site (identified by the shadow of the glass pipette and the distortion created at the time of injection). We quantify the microglia response over the time R(t):

$$R(t) = \frac{[R1(t) - \overline{R1(0)}]}{\overline{R1(0)}}$$

R1(0) is the mean of the R1(t) values before the local application. Then, the results are represented as a kinetic of the microglia response R(t) or as a maximum of microglia response.

Microglial basal surveillance. Analysis and quantification of microglial surveillance was performed as described in (Madry et al., 2018b). Briefly, cells of interest were individually selected by manually drawing a region of interest (ROI) around an area including all their processes extensions over the whole duration and erasing data outside that ROI. Then, we performed a maximum intensity projection and registered the resulting two-dimensional movies. Individual cells were then manually thresholded, binarized and saved as independent files and microglia surveillance was quantified using a MATLAB script from (Madry et al., 2018b) and available at <https://github.com/AttwellLab/Microglia>.

Number of microglial bulbous tips after bath application of ATP or 5-HT. Analysis and quantification were performed on maximum intensity projections two-dimensional movies. The number of microglial bulbous tips was estimated with the “Spot Detector” plugin from Icy software. Parameters were adapted in order to detect bright spots over a black background, the scale was used to detect objects size around ~ 3 pixels with a sensitivity of 70 (most appropriate settings regarding the bulbous tips size and fluorescence). Results were normalized with the mean number of bulbous tips measured during the 10 min of baseline.

For “ACSF” groups, as we never observed differences among genotypes, we pooled data from different genotypes.

Drugs and Dialysis

Drugs were obtained from Sigma-Aldrich (ATP disodium salt hydrate, serotonin hydrochloride, RS-127445 hydrochloride and apyrase) or Tocris (PSB-0739 and ARL-67156 trisodium salt). All these compounds were applied on acute brain slices locally via pressure ejection from a puffing glass pipette placed at the slice surface except for ARL-67156 which was applied via bath perfusion.

According to (Madry et al., 2018a), Apyrase was dialyzed 2x1 hour against ACSF in a 3-mL 7K cassette (Slide-A-Lyzer, Thermo Scientific).

Viral constructs and stereotaxic injections

To transfect 5-HT neurons selectively with GFP, a Cre-inducible recombinant viral vector (AAV1-CAG-Flex-eGFP-WPRE-bGH, 1/3 dilution, Penn Core Vector, University of Pennsylvania USA) was stereotaxically injected (150 nL) in the B7 nucleus of $Pet1^{Cre/+}$; $Cx3cr1^{GFP/+}$ mice at P30 according to the following coordinates (in mm): Antero-posterior: 0,5 from lambda, medio-lateral: 0,75 and dorsoventral: -3,2. Mice were anesthetized with ketamine (150 mg/kg) / xylazine (10 mg/kg) for the surgery procedure.

Immunostaining

$Pet1^{Cre/+}$; $Cx3cr1^{GFP/+}$ mice injected with the AAV1-CAG-Flex-eGFP-WPRE-bGH in the B7 raphe nucleus were anesthetized with a lethal dose of sodium-pentobarbital and fixed by transcardial perfusion of 4% of paraformaldehyde (PFA). Brains were removed and post-fixed for 24 h in PFA 4%. Sagittal sections (50 μ m thickness) were cut on a Vibratome (Leica). Immunostaining were performed on floating slices after 60 min of incubation in a block solution (PBS 1X, 1% BSA, 0.3% Triton). 5-HT neurons were targeted by using both antibody for Tryptophan hydroxylase 2 (Tph2) and the serotonin transporter SERT. Slices were then incubated with primary antibodies Sheep anti-Tph2 (1:500) and Rabbit anti-SERT (1:1000) in PBS, 0.5% BSA, 0.3% Triton overnight at 4°C with gentle agitation. After rinsing 3 times during 30 min with PBS, 0.5% BSA, 0.3% Triton, slices were incubated with secondary

antibodies Donkey anti-Goat-Cy3 (1:400) and Donkey anti-Rabbit-Cy5 (1:500) in PBS, 0.5% BSA, 0.3% Triton for 2 h at room temperature, protected from light. After rinsing 3 times during 30 min, slices when mounted in Mowiol with DAPI (1:2000).

Statistics

Data are presented as mean \pm SEM.

Results

The microglial 5-HT_{2B} receptor is necessary for microglial processes outgrowth toward 5-HT

We have previously shown that 5-HT induces a directional motility of microglial processes in brain slices from P11-P14 mice (Kolodziejczak et al., 2015). In order to extend this study, we first checked that serotonin also promotes a microglial response in older animals (P21-P60) (**figure 1A**). To further investigate the role of the 5-HT_{2B} receptor on microglial processes motility, we used two different mice models. The first is a mouse full knock-out (KO) for the 5-HT_{2B} receptor (*Htr2b*^{-/-}) and expressing the GFP in microglia, *Htr2b*^{-/-}; *Cx3cr1*^{GFP/+} mice (or WT). The second mouse model is a conditional knock out (cKO) that invalidates specifically the expression of this receptor in microglia, *Cx3cr1*^{CreERT2/+}; *Htr2b*^{fl/fl}; *RCE/RCE* (or *Htr2b*^{fl/fl}; *RCE/RCE* cWT). Experiments were performed on acute brain slices in the thalamic region. We quantified the attraction of processes by measuring the mean fluorescence intensity in a circle centered on the injection site over the time. We observed that the response to 5-HT was abolished in full KO mice ($p = 0.0001$) (**figure 1B, 1D**), confirming the results previously obtained on younger animals (Kolodziejczak et al., 2015). Importantly, it was abolished in cKO mice as well ($p < 0.0001$) (**figure 1C, 1E**). Nevertheless, a microglial response to ATP could be induced in both mutant models (**figure 1B-E**), although slightly decreased in KO mice ($p(\text{WT vs cKO}) = 0.0291$) (**figure 1D**). These results thus show that the specific deletion of 5-HT_{2B} receptor in microglia totally abolished the microglial response toward serotonin but did not affect the response to ATP, meaning that the 5-HT_{2B} receptor deletion does not induce a general impairment of microglia to respond to local cues.

The lack of 5-HT_{2B} receptors does not affect microglia surveillance in basal condition

We next examined whether lack of the 5-HT_{2B} receptor impairs microglial surveillance in basal condition. Movements of microglial processes were recorded during 30 min in *Htr2b*^{+/+}; *Cx3cr1*^{GFP/+} and *Htr2b*^{-/-}; *Cx3cr1*^{GFP/+} mice. By using the Matlab script available in (Madry et al., 2018b) to compare images at different time points (exemplified in **figure 2A**) we quantified microglial surveillance parameters. We observed no difference in the surveillance index of either genotypes ($p = 0.2173$) (**figure 2B**). By plotting the time course of the pixels surveyed (**figure 2C**), the initial slope of surveillance was determined (**figure 2D**) and both were found undisturbed by the absence of 5-HT_{2B} receptors ($p = 0,1356$ for 2C and $p = 0.1850$ for 2D). Thus, the deletion of the 5-HT_{2B} receptor does not affect basal microglial surveillance.

In addition, we tested whether 5-HT applied without directionality could induce morphological changes as does ATP (Haynes et al., 2006) or Norepinephrine (Liu et al., 2019). A bath application of ATP induced a rapid formation of bulbous tips at the end of microglial processes (**Figure 3A**), as expected (Dissing-Olesen et al., 2014), and this effect was induced normally in the absence of 5-HT_{2B} receptor (**Figure 3B-C**). In contrast, superfusion of the slices with 5-HT did not induce such changes (**Figure 3B-C**), confirming previous observations that directed outgrowth of microglial processes and basal surveillance rely on distinct mechanisms (Madry et al., 2018b).

P2Y₁₂ receptor and extracellular ATP/ADP are involved in microglia processes attraction toward 5-HT

The convergence of microglial processes toward 5-HT application site is quite similar to that toward ATP (**Figure 1D, 1E**). Moreover, a similar percentage of microglia (around 70%) is responding to 5-HT and to ATP in an 80µm radius circle around the pipette tip and this drops to 10% when distance increases to 80-110 µm (**figure S1B**). This suggests that 5-HT and ATP effects may result from a similar mechanism. Moreover, a secondary release of ATP is involved in the directional motility induced by NMDA (Dissing-Olesen et al., 2014), and has been proposed for the outgrowth toward a lesion or ATP itself (Davalos et al., 2005) and toward NO (Hines et al., 2009). Microglial processes outgrowth toward ATP is well described in the literature and requires activation of P2Y₁₂ receptors (Davalos et al., 2005; Haynes et al., 2006), which are strongly expressed by microglia (Hickman et al., 2013). We thus tested the hypothesis that the P2Y₁₂ receptor could be involved in the response to 5-HT. By using pharmacological compounds, we inhibited either the 5-HT_{2B} receptor with its selective antagonist RS-127445 or the P2Y₁₂ receptor with its selective antagonist PSB-0739. We locally applied 5-HT or ATP, quantified microglial response, and observed that the inhibition of the 5-HT_{2B} receptor did not affect microglial response toward ATP ($p = 0.8270$) whereas this response was blocked by PSB-0739 ($p < 0.0001$) (**figure 4A and B**). Surprisingly, by inhibiting the P2Y₁₂ receptor, the microglial response toward 5-HT was abolished ($p < 0.0001$) (**figure 4C and D**). The use of the 5-HT_{2B} receptor selective antagonist abolished the microglial response toward 5-HT ($p < 0.0001$), consistently with the results found with the two transgenic mice models (**figure 1**) and previously (Kolodziejczak et al., 2015). It is known that the activation of the P2Y₁₂ receptor can be mediated by ADP, which has a higher affinity for this receptor (von Kügelgen and Hoffmann, 2016)). Indeed, microglia express at their membrane ecto-nucleotidases that can hydrolyze ATP in ADP, and this conversion is required for some effects of ATP (Färber et al., 2008; Matyash et al., 2017) (Madry et al., 2018a). To investigate how microglial processes attraction toward 5-HT requires extracellular ATP/ADP, we used two different ways to block the production of extracellular ADP from ATP, either by apyrase which degrades ATP to AMP or by ARL-67156 which prevents the conversion of ATP in ADP. We observed that the use of either apyrase or ARL-67156 strongly decreased the microglial response toward ATP (respectively $p < 0.0001$ and $p = 0.0006$) but also toward 5-HT (respectively $p = 0.0284$ and $p = 0.0038$) (**figure 3E**). These results demonstrate that purinergic signaling, via extracellular ATP, likely generating ADP, and P2Y₁₂ receptor, is required for microglial processes outgrowth toward 5-HT.

Microglia processes spontaneously contact serotonergic neuron fibers

By applying locally 5-HT, we were able to observe a microglial response characterized by an outgrowth of microglial process toward 5-HT. Previous studies showed, on fixed brain slices and 3D reconstructions of confocal stacks, very close contacts between microglial processes and serotonergic axons in the dLGN (Thalamus) (Kolodziejczak et al., 2015). We were wondering how dynamic these interactions are. To answer this question, we used viral stereotaxic injections in B7 raphe nucleus of Pet1^{Cre/+}; Cx3cr1^{GFP/+} mice, to specifically expressed GFP in serotonergic neurons. Three weeks after injection of the virus, mice were perfused with paraformaldehyde, sagittal brain sections and immunostaining against 5-HT neurons with the use of an anti-Tph2 were performed. Confocal acquisitions revealed that neurons expressing the GFP are serotonergic neurons (**figure 5A**). Between three and four weeks after injection of the virus, sagittal acute brain slices were performed and microglia – neurons interactions were imaged by 2-photon microscopy during 30 min (**movie 5**). During the time-lapse of acquisition, spontaneous contacts between microglial processes and a

serotonergic neuron fiber were observed at $t=18$ min and $t=22$ min after the beginning of the recording (**figure 5B**). This experiment confirmed the dynamic interactions between microglia and serotonergic axons.

Discussion

In this work, we assessed the contribution of microglial 5-HT_{2B} receptors in the response of microglia to local injection of 5-HT, by two-photon microscopy on acute brain slices. We uncovered a role of this receptor on the directional attraction of microglial processes in a gradient of 5-HT. We further demonstrated by using a pharmacological approach that the purinergic signaling pathway of P2Y₁₂ receptors is also required for microglial processes attraction toward 5-HT: generation of extracellular ADP is necessary to induce P2Y₁₂ receptor activation and thus trigger 5-HT effects. Finally, we were able to visualize spontaneous dynamic contacts between microglial processes and serotonergic neuron fibers by using viral conditional expression and acute brain slices. Together, these results demonstrate that 5-HT_{2B} receptors control microglia processes motility and attraction toward 5-HT in a P2Y₁₂R-dependent manner.

It is now well known that microglia constantly extend and retract their processes in physiological conditions in order to survey their environment. This survey allows microglia to sense any homeostatic disruptions (Nimmerjahn et al., 2005) (Davalos et al., 2005). Over the last decades, by generating a laser lesion or applying locally ATP to trigger a response of microglia (Davalos et al., 2005), it has been modeled that ATP is an important molecule mediating “find-me” signals for immune cells. Microglial process outgrowth toward ATP is well described in the literature, see for review (Calovi et al., 2019), and requires the activation of purinergic P2Y₁₂ receptors (Haynes et al., 2006) which are selectively expressed by microglia in the brain (Hickman et al., 2013). Our previous study showed that 5-HT also can promote a microglial processes extension response (Kolodziejczak et al., 2015). Here, we show that the specific deletion of 5-HT_{2B} receptors in microglia totally abolished microglia processes extension toward serotonin. In contrast, it did not affect the response to ATP, neither locally or after bath application, meaning that the 5-HT_{2B} receptor deletion in microglia does not modify microglia response in general.

As we observed that the microglial process outgrowth toward 5-HT was quite similar to that of ATP, we tested the hypothesis that purinergic signaling was involved in the response to 5-HT. Surprisingly, we found that indeed, extracellular ATP/ADP and P2Y₁₂ receptor are required for microglial processes outgrowth toward 5-HT. Altogether, these results reveal that 5-HT triggers a directional motility of microglial processes through activation of the microglial 5-HT_{2B} receptor and that this effect requires activation of P2Y₁₂ receptors by extracellular ATP/ADP.

It has been reported that P2Y₁₂ receptor signaling is not required to maintain microglial ramification and surveillance (Madry et al., 2018a), since the constant surveillance of the brain by microglia is unaffected by knockout of *P2ry12* gene although microglia of *P2ry12*^{-/-} mice show reduced capacity to polarize, migrate, or generate process extensions toward nucleotides (Haynes et al., 2006). Conversely, lack or inhibition of the K⁺ channel THIK1 impairs surveillance but not directional motility (Madry et al., 2018b). This implies that surveillance is controlled by a different mechanism than directional motility. In the mouse brain, signaling of another neuromodulator, norepinephrine, has been reported to be necessary for the microglial process surveillance (Liu et al., 2019)(Stowell et al., 2019). We thus examined whether the deletion of the 5-HT_{2B} receptor impairs microglial surveillance in basal condition but we found that it did not. Thus, 5-HT_{2B} receptors on microglia trigger a directional motility of the microglial processes toward 5-HT but are not involved in basal surveillance

Although the mechanism by which 5-HT triggers the extension of microglial processes remains to be firmly established, we have shown that it is dependent on P2Y₁₂ receptors and production of extracellular ADP from ATP. Interestingly, application of NMDA triggers microglia process outgrowth by inducing an ATP release secondary to NMDA receptor activation taking place on neurons. Since the NMDA-induced microglia process extension was independent of ATP release from astrocyte, this work demonstrated a direct neuron to microglia communication mediated by ATP (Dissing-Olesen et al., 2014). Alternatively, a release of ATP by astrocytes, has been proposed to be involved to sustain the directional extension of microglial processes toward a lesion (Davalos et al., 2005). For serotonin, our results indicate that microglia are the initial and direct targets of 5-HT. This prompts us to propose a model (**figure 6**) where 5-HT triggers the release by microglia of a small amount of ATP or of another factor inducing a secondary release of ATP by, *e.g.*, astrocytes. ATP is immediately broken down by microglial ecto-nucleotidases to ADP (Färber et al., 2008; Matyash et al., 2017), which activates P2Y₁₂R and amplifies the directional growth of microglial processes.

Indeed, it has already been shown that microglia can rapidly release small amounts of ATP upon stimulation of their toll-like receptors, and that astrocytes, in turn, can amplify this release (Pascual et al., 2012).

Release of ATP by microglia, at least in primary culture, seems to occur from lysosomes (Dou et al., 2012), and to involve a Ca²⁺-dependent exocytosis (Imura et al., 2013). It is known that stimulation of 5-HT_{2B} receptors triggers the release of exosomes through a Ca²⁺-dependent mechanism (Glebov et al., 2015). Thus, to test our model, it would be interesting to determine whether 5-HT_{2B} receptors can also induce the release of ATP by exocytosis.

The co-implication of 5-HT and P2Y₁₂ receptors that we uncovered for microglial processes extension has an interesting similarity with platelet activation and aggregation. Indeed, both ADP and 5-HT can also induce platelet aggregation, through activation of platelets P2Y₁₂ and 5-HT_{2A} (which is structurally close to 5HT_{2B}) receptors, respectively. Actually, the therapeutic compound clopidogrel is a prodrug which generates a metabolite preventing platelet aggregation by blocking P2Y₁₂ receptors (von Kügelgen and Hoffmann, 2016), and similarly, the platelet antiaggregant sarpogrelate is a preferential antagonist of 5-HT_{2A} receptors (Saini et al., 2004). *In vivo*, both receptors are likely activated together to induce aggregation, as platelet dense granules store together small molecules including ADP, ATP, Ca²⁺, and 5-HT (Chen et al., 2018). Moreover, similarly to platelet aggregation, the extension of microglial processes relies on the activation of integrins: when this directional motility is directly induced by ATP, it implies activation of β 1-integrins at the tip of the processes (Ohsawa et al., 2010); when it is induced by a laser lesion which releases ATP but also disrupts vessels and releases fibrinogen, it recruits CD11b/CD18 integrins (Davalos et al., 2012). It is thus tempting to speculate that the intracellular signaling linking GPCR to integrin activation and cytoskeletal rearrangements in microglial processes will display a strong similarity with the transduction cascades known in platelets.

By applying 5-HT locally, we were able to induce an outgrowth of microglial process toward the source of 5-HT. In addition, previous studies had shown, on fixed brain slices and 3D reconstructions of confocal stacks, very close contacts between microglial processes and serotonergic varicosities in the thalamus (Kolodziejczak et al., 2015). This led us to postulate that microglial processes might be attracted by serotonin release sites as small as varicosities on serotonergic axons, which may instruct microglia and eventually prompt them to modulate neurons in return. Indeed, our recordings on acute brain slices labeled for microglia and serotonergic fibers confirmed the dynamic interactions between microglia processes and serotonergic varicosities, but it remains to be demonstrated that they are triggered by local 5-HT release.

In addition to this putative physiological interaction of microglia and serotonergic neurons, as platelets from damaged vessels release large amounts of 5-HT, the effect of 5-HT on microglia that we characterized could also participate to the recruitment of microglial processes in lesioned areas to prevent tissue damage (Davalos et al., 2012). Further experiments will be required to explore this possibility.

In conclusion, our work identified 5-HT as a new inducer of microglia directional motility, through direct stimulation of the microglial 5-HT_{2B} receptors and indirect activation of purinergic signaling. Considering the role of microglia in the regulation of synapses and in homeostasis maintenance, variations in serotonin availability or in the expression level of the 5-HT_{2B} receptor could thus be at the origin of altered microglia regulation with possible consequences on neuronal functions and tissue repair.

Acknowledgment.

This work has been supported in part by funds from the *Centre National de la Recherche Scientifique*, the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*, the *Sorbonne Université Sciences - Pierre et Marie Curie (Emergence-UPMC program 2011/2014)*, and by grants from the *Fondation pour la Recherche sur le Cerveau*, the *Fondation de France*, the *Fondation pour la Recherche Médicale "Equipe FRM DEQ2014039529"*, the French Ministry of Research (Agence Nationale pour la Recherche ANR-17-CE16-0008 and the Investissements d'Avenir programme ANR-11-IDEX-0004-02). LM and AR's team is part of the *École des Neurosciences de Paris Ile-de-France* network and of the *Bio-Psy Labex* and as such this work was supported by French state funds managed by the ANR within the Investissements d'Avenir programme under reference ANR-11-IDEX-0004-02.

We thank the IFM Imaging facility, and the IFM animal facility.

Disclosure.

The authors have nothing to disclose.

References

- Belmer, A., Quentin, E., Diaz, S.L., Guiard, B.P., Fernandez, S.P., Doly, S., Banas, S.M., Pitychoutis, P.M., Moutkine, I., Muzerelle, A., *et al.* (2018). Positive regulation of raphe serotonin neurons by serotonin 2B receptors. *Neuropsychopharmacology* *43*, 1623–1632.
- Calovi, S., Mut-Arbona, P., and Sperlágh, B. (2019). Microglia and the Purinergic Signaling System. *Neuroscience* *405*, 137-147.
- Charolidi, N., Schilling, T., and Eder, C. (2015). Microglial Kv1.3 Channels and P2Y12 Receptors Differentially Regulate Cytokine and Chemokine Release from Brain Slices of Young Adult and Aged Mice. *PLoS one* *10*, e0128463.
- Chen, Y., Yuan, Y., and Li, W. (2018). Sorting machineries: how platelet-dense granules differ from α -granules. *Bioscience Reports* *38*.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Gan, W.B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* *8*, 752-758.
- Dissing-Olesen, L., LeDue, J.M., Rungta, R.L., Hefendehl, J.K., Choi, H.B., and MacVicar, B.A. (2014). Activation of Neuronal NMDA Receptors Triggers Transient ATP-Mediated Microglial Process Outgrowth. *J Neurosci* *34*, 10511-10527.
- Doly, S., Quentin, E., Eddine, R., Tolu, S., Fernandez, S., Bertran-Gonzalez, J., Valjent, E., Belmer, A., Viñals, X., Callebert, J., *et al.* (2017). Serotonin 2B receptors in mesoaccumbens dopamine pathway regulate cocaine responses. *J Neurosci* *37*, 10372-10388.
- Dou, Y., Wu, H.-j., Li, H.-q., Qin, S., Wang, Y.-e., Li, J., Lou, H.-f., Chen, Z., Li, X.-m., Luo, Q.-m., *et al.* (2012). Microglial migration mediated by ATP-induced ATP release from lysosomes. *Cell Research* *22*, 1022-1033.
- Etienne, F., Mastrolia, V., Maroteaux, L., Girault, J.-A., Gervasi, N., and Roumier, A. (2019). Two-photon Imaging of Microglial Processes' Attraction Toward ATP or Serotonin in Acute Brain Slices. *JoVE* *143*, e58788.
- Glebov, K., Löchner, M., Jabs, R., Lau, T., Merkel, O., Schloss, P., Steinhäuser, C., and Walter, J. (2015). Serotonin stimulates secretion of exosomes from microglia cells. *Glia* *63*, 626-634.
- Hanisch, U.-K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* *10*, 1387-1394.

- Haynes, S.E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M.E., Gan, W.-B., and Julius, D. (2006). The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nature Neuroscience* 9, 1512-1519.
- Hickman, S.E., Kingery, N.D., Ohsumi, T.K., Borowsky, M.L., Wang, L.-c., Means, T.K., and El Khoury, J. (2013). The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nature Neuroscience* 16, 1896-1905.
- Imura, Y., Morizawa, Y., Komatsu, R., Shibata, K., Shinozaki, Y., Kasai, H., Moriishi, K., Moriyama, Y., and Koizumi, S. (2013). Microglia release ATP by exocytosis. *Glia* 61, 1320-1330.
- Jiang, P., Xing, F., Guo, B., Yang, J., Li, Z., Wei, W., Hu, F., Lee, I., Zhang, X., Pan, L., *et al.* (2017). Nucleotide transmitters ATP and ADP mediate intercellular calcium wave communication via P2Y_{12/13} receptors among BV-2 microglia. *PLoS one* 12, e0183114.
- Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A., and Littman, D.R. (2000). Analysis of fractalkine receptor CX₃CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 20, 4106-4114.
- Koizumi, S., Ohsawa, K., Inoue, K., and Kohsaka, S. (2013). Purinergic receptors in microglia: functional modal shifts of microglia mediated by P2 and P1 receptors. *Glia* 61, 47-54.
- Kolodziejczak, M., Bechade, C., Gervasi, N., Irinopoulou, T., Banas, S.M., Cordier, C., Rebsam, A., Roumier, A., and Maroteaux, L. (2015). Serotonin modulates developmental microglia via 5-HT_{2B} receptors: potential implication during synaptic refinement of retinogeniculate projections. *ACS Chem Neurosci* 6, 1219-1230.
- Kopec, A.M., Smith, C.J., Ayre, N.R., Sweat, S.C., and Bilbo, S.D. (2018). Microglial dopamine receptor elimination defines sex-specific nucleus accumbens development and social behavior in adolescent rats. *Nature communications* 9, 3769.
- Krabbe, G., Matyash, V., Pannasch, U., Mamer, L., Boddeke, H.W.G.M., and Kettenmann, H. (2012). Activation of serotonin receptors promotes microglial injury-induced motility but attenuates phagocytic activity. *Brain Behav Immun* 26, 419-428.
- Li, Y., Du, X.-F., Liu, C.-S., Wen, Z.-L., and Du, J.-L. (2012). Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Dev Cell* 23, 1189-1202.
- Liu, Y.U., Ying, Y., Li, Y., Eyo, U.B., Chen, T., Zheng, J., Umpierre, A.D., Zhu, J., Bosco, D.B., Dong, H., *et al.* (2019). Neuronal network activity controls microglial process surveillance in awake mice via norepinephrine signaling. *Nature Neurosci* 22, 1771-1781.
- Madry, C., Arancibia-Cárcamo, I.L., Kyrargyri, V., Chan, V.T.T., Hamilton, N.B., and Attwell, D. (2018a). Effects of the ecto-ATPase apyrase on microglial ramification and surveillance reflect cell depolarization, not ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 115, E1608-E1617.
- Madry, C., Kyrargyri, V., Arancibia-Cárcamo, I.L., Jolivet, R., Kohsaka, S., Bryan, R.M., and Attwell, D. (2018b). Microglial Ramification, Surveillance, and Interleukin-1 β Release Are Regulated by the Two-Pore Domain K⁺ Channel THIK-1. *Neuron* 97, 299-312.e296.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314-1318.
- Ohsawa, K., Irino, Y., Sanagi, T., Nakamura, Y., Suzuki, E., Inoue, K., and Kohsaka, S. (2010). P2Y₁₂ receptor-mediated integrin- β 1 activation regulates microglial process extension induced by ATP. *Glia* 58, 790-801.
- Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., *et al.* (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333, 1456-1458.
- Parkhurst, C N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J N., Iii, J R.Y., Lafaille, J J., Hempstead, B L., Littman, D R., and Gan, W.-B. (2013). Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell* 155, 1596-1609.

- Pascual, O., Ben Achour, S., Rostaing, P., Triller, A., and Bessis, A. (2012). Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci USA* *109*, E197-205.
- Petersen, M.A., and Dailey, M.E. (2004). Diverse microglial motility behaviors during clearance of dead cells in hippocampal slices. *Glia* *46*, 195-206.
- Pitulescu, M.E., Schmidt, I., Benedito, R., and Adams, R.H. (2010). Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice. *Nat Protoc* *5*, 1518-1534.
- Pocock, J.M., and Kettenmann, H. (2007). Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci* *30*, 527-535.
- Saini, H.K., Takeda, N., Goyal, R.K., Kumamoto, H., Arneja, A.S., and Dhalla, N.S. (2004). Therapeutic potentials of sarpogrelate in cardiovascular disease. *Cardiovasc Drug Rev* *22*, 27-54.
- Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Barres, B.A., and Stevens, B. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* *74*, 691-705.
- Scott, M.M., Krueger, K.C., and Deneris, E.S. (2005a). A differentially autoregulated Pet-1 enhancer region is a critical target of the transcriptional cascade that governs serotonin neuron development. *J Neurosci* *25*, 2628-2636.
- Scott, M.M., Wylie, C.J., Lerch, J.K., Murphy, R., Lobur, K., Herlitze, S., Jiang, W., Conlon, R.A., Strowbridge, B.W., and Deneris, E.S. (2005b). A genetic approach to access serotonin neurons for in vivo and in vitro studies. *Proc Natl Acad Sci USA* *102*, 16472-16477.
- Sierra, A., Encinas, J.M., Deudero, J.J.P., Chancey, J.H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L.S., Tsirka, S.E., and Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* *7*, 483-495.
- Smith, T.H., Li, J.G., Dores, M.R., and Trejo, J. (2017). Protease-activated receptor-4 and purinergic receptor P2Y₁₂ dimerize, co-internalize, and activate Akt signaling via endosomal recruitment of β -arrestin. *J Biol Chem* *292*, 13867-13878.
- Stowell, R.D., Sipe, G.O., Dawes, R.P., Batchelor, H.N., Lordy, K.A., Whitelaw, B.S., Stoessel, M.B., Bidlack, J.M., Brown, E., Sur, M., *et al.* (2019). Noradrenergic signaling in the wakeful state inhibits microglial surveillance and synaptic plasticity in the mouse visual cortex. *Nature Neurosci* *22*, 1782-1792.
- Tremblay, M.E., Lowery, R.L., and Majewska, A.K. (2010). Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol* *8*, e1000527.
- von Kügelgen, I., and Hoffmann, K. (2016). Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology* *104*, 50-61.
- Wake, H., Moorhouse, A.J., Jinno, S., Kohsaka, S., and Nabekura, J. (2009). Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* *29*, 3974-3980.
- Xia, Q.-P., Cheng, Z.-Y., and He, L. (2019). The modulatory role of dopamine receptors in brain neuroinflammation. *Int Immunopharmacol* *76*, 105908.

Figure legends

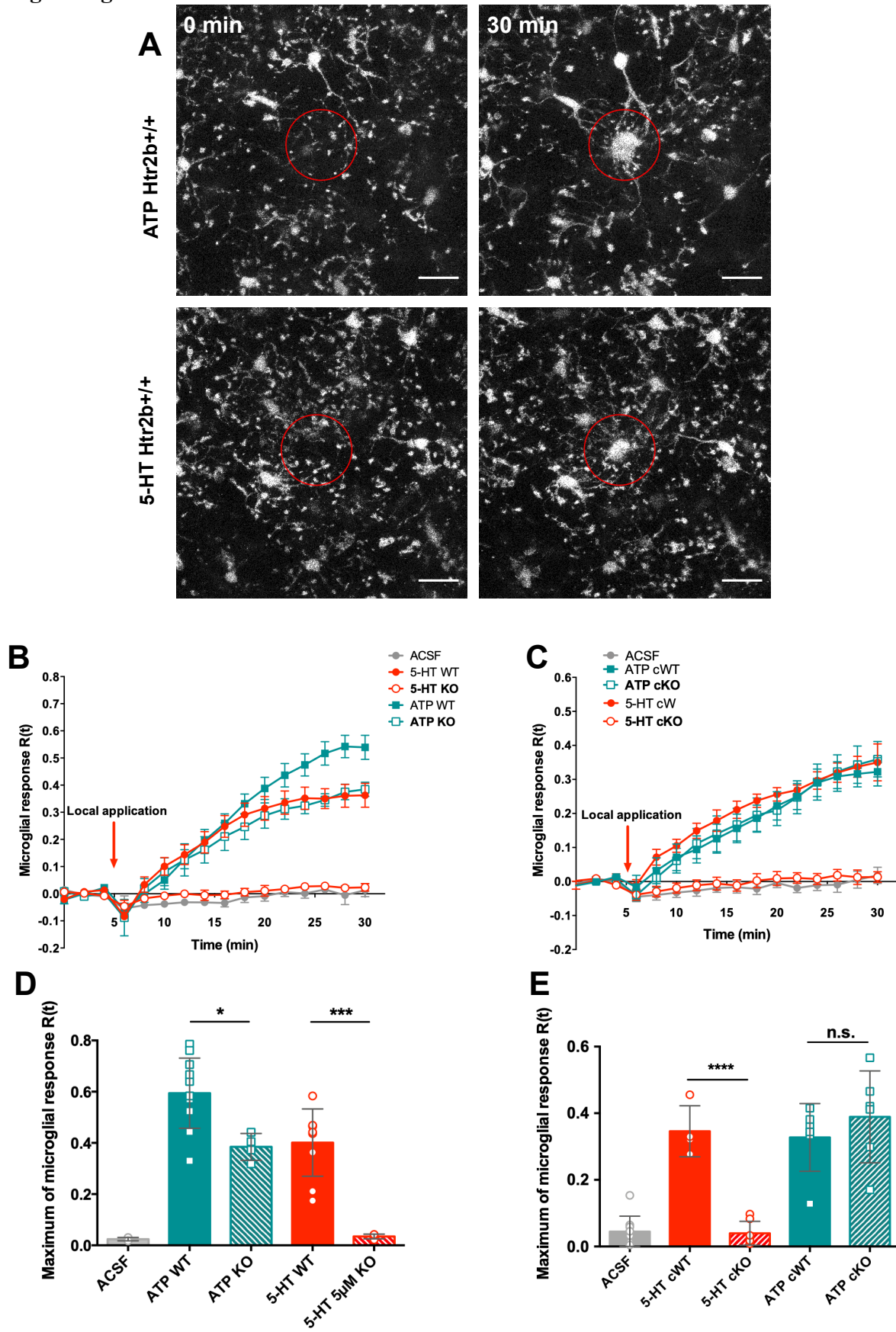


Figure 1: Microglia processes attraction toward a local application of 5-HT is directly mediated by the microglial 5-HT_{2B} receptor. (A) Microglial response to ATP (top) or 5-HT (bottom) at 0 and 30 min after local application with a glass pipette, scale bar: 20 μ m. The red circles are centered at the application site and represent regions used for fluorescence quantification. (B) Quantification of microglial response toward ACSF (control, n=3), ATP 500 μ M (*Htr2b*^{+/+} WT, n=11 and *Htr2b*^{-/-} KO, n=4) or 5-HT 5 μ M (WT n=9 and KO n=4). The lack of the 5-HT_{2B} receptor affects the microglial response toward 5-HT but not toward ATP. (C) Quantification of microglial response toward ACSF (control, n=9), ATP 500 μ M or 5 μ M 5-HT in mice conditionally invalidated for Htr2b in microglia (cKO) and their controls (cWT) (for ATP: *Htr2b*^{fl/fl}; *RCE/RCE*, cWT n=6 and *Cx3cr1*^{CreERT2/+}; *Htr2b*^{fl/fl}; *RCE/RCE*, cKO n=6; for 5-HT: cWT n=4 and cKO n=7) in brain slices. (D) and (E) represent respectively the maximum of microglial response of the graphs (B) and (C). One way Anova, Tukey's multiple comparisons test; data are represented as mean \pm SEM.

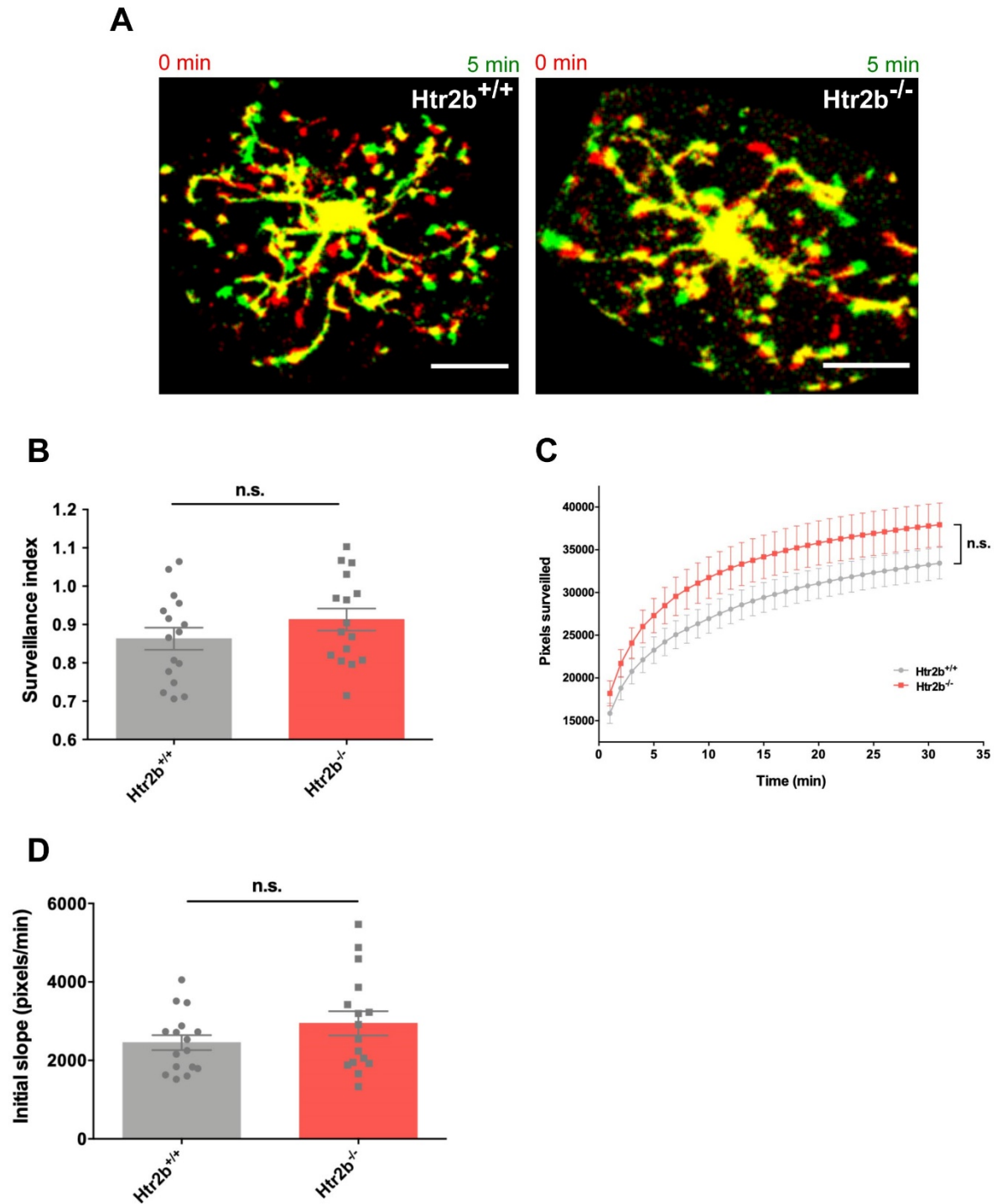


Figure 2: The lack of the 5-HT_{2B} receptor does not affect microglial surveillance. (A) Representative images taken 5 min apart of *Cx3cr1^{GFP/+}; Htr2b^{+/+}* (WT) and *Cx3cr1^{GFP/+}; Htr2b^{-/-}* (KO) microglia showing the process extensions and retractions (from 0 min in red to 5 min in green), scale bar: 20 μ m. (B) Quantification of surveillance for microglia from WT (n = 16) and KO (n = 16) mice for the 5-HT_{2B} receptor, showing no difference between WT and KO. (C) Time course of increase of the number of surveyed pixels in maximum-intensity projections of images of microglia from both WT and KO mice. The initial value is the area of the cell in the first image frame. (D) Initial slope of graphs in (C). (B, D) Unpaired t test; data are represented as mean \pm SEM.

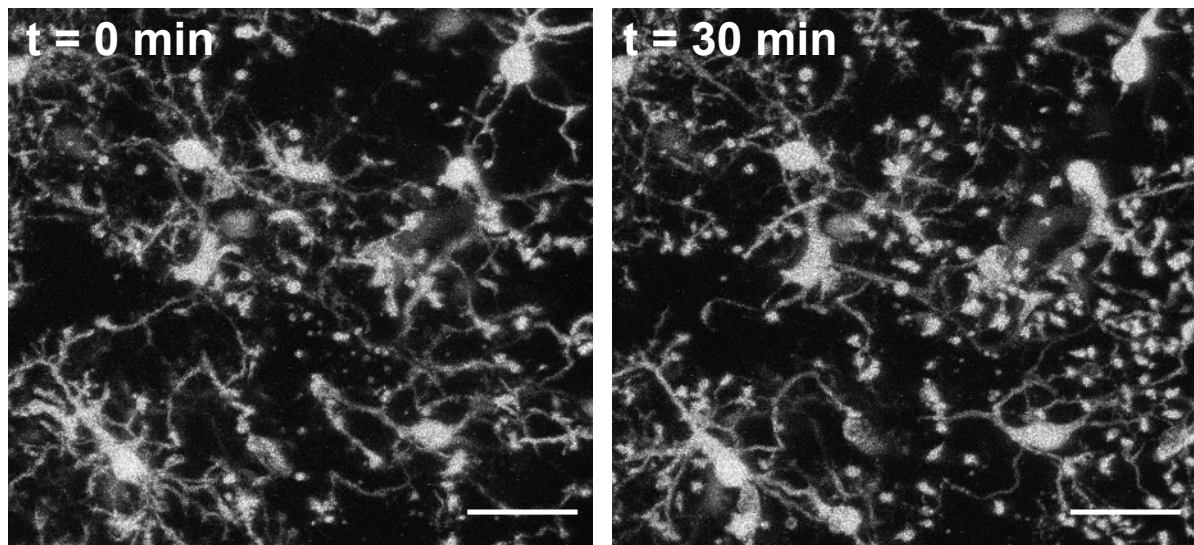
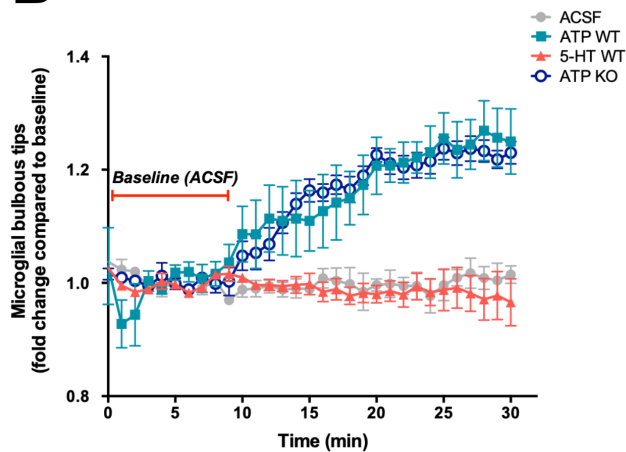
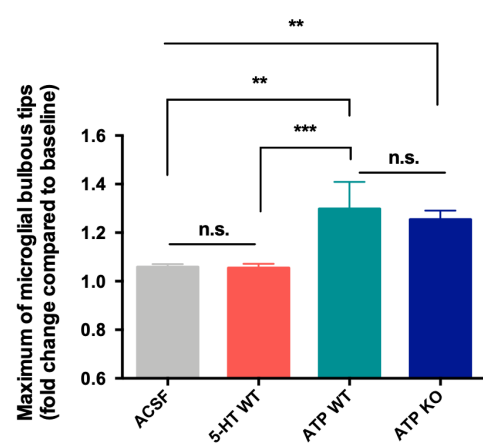
A**B****C**

Figure 3: Bath application of serotonin does not affect the number of microglial processes bulbous tips. (A) Representative images taken at time 0 and 30 min after a bath application of 500 μM ATP on acute brain slices from *Cx3cr1^{GFP/+}* mouse. Scale bar: 20 μM . (B) Quantification of the number of bulbous tips in basal conditions (10 min of baseline) and after a bath application of ATP 500 μM on slices from WT (light blue, $n = 5$) or full 5-HT_{2B} KO mice (dark blue, $n = 4$), of 5 μM 5-HT in WT mice (red, $n = 3$), and of ACSF ($n = 3$). (C) Maximum amount of microglial bulbous tips induced in the conditions presented in (B). One-way Anova, Tukey's multiple comparisons test; data are represented as mean \pm SEM.

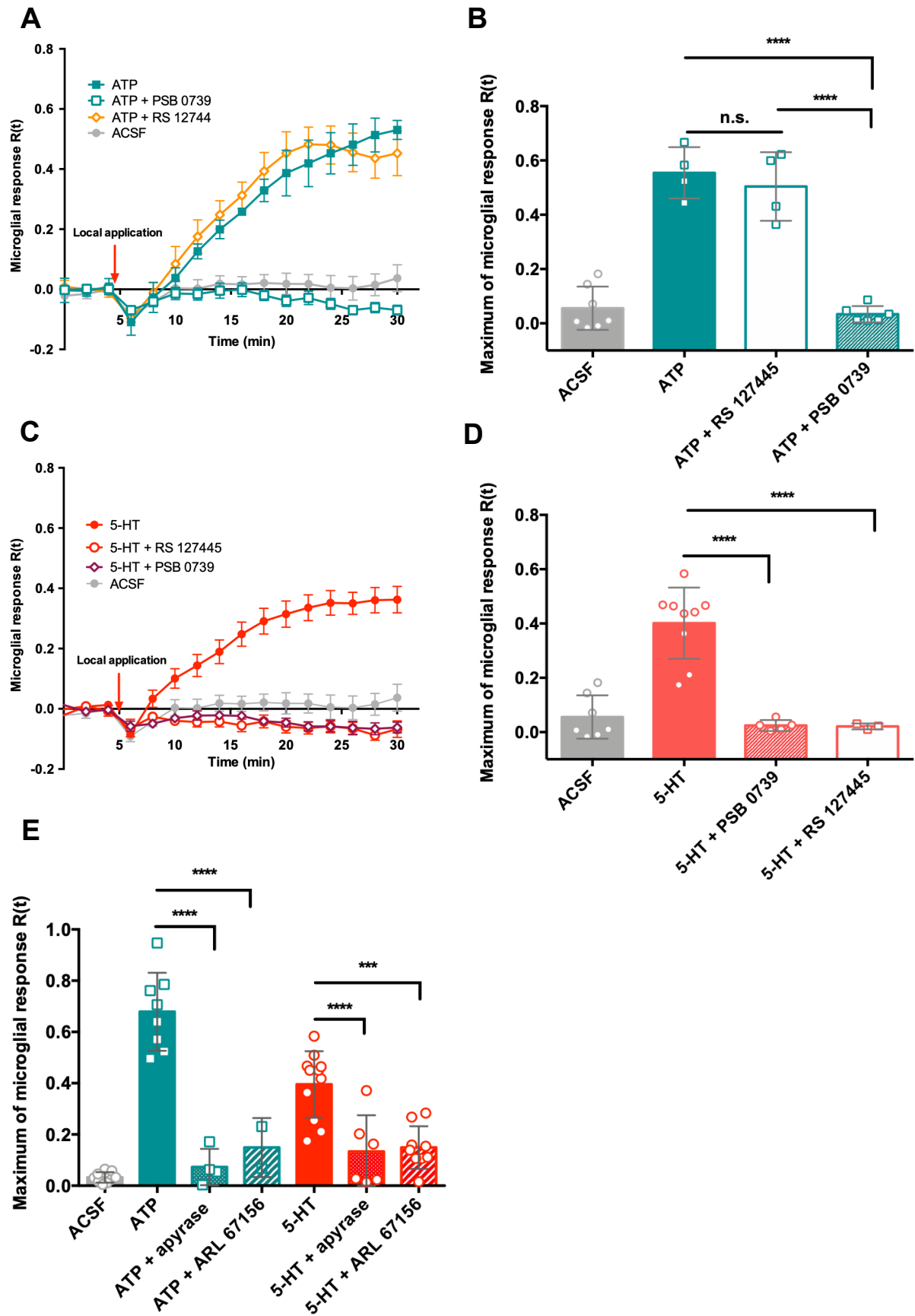


Figure 4: P2Y12 receptors and extracellular ATP/ADP are necessary for microglia processes directional motility toward 5-HT. (A, C) Microglial response $R(t)$ over time toward a local application of ACSF (control, $n=7$), ATP 500 μM ($n=4$), ATP 500 μM + PSB

0739 5 μ M (n=6), ATP 500 μ M + RS 127445 5 μ M (n=4), 5-HT 5 μ M (n=9), 5-HT 5 μ M + PSB0739 5 μ M (n=5) or 5-HT 5 μ M + RS 127445 5 μ M (n=3). RS 127445 is a 5-HT_{2B} receptor selective antagonist whereas the PSB 0739 is a P2Y₁₂ receptor selective antagonist. **(B, D)** Maximum of microglial response of the graphs **(A)** and **(C)**. Blocking the 5-HT_{2B} receptor with RS 127445 inhibits microglial response toward 5-HT but not toward ATP while blocking the P2Y₁₂ receptor with PSB 0739 inhibits microglial response toward both ATP and 5-HT. **(E)** Maximum of microglial response toward a co-application of ATP 500 μ M or 5-HT 5 μ M with an ecto-ATPase inhibitor ARL-67156 200 μ M or dialyzed apyrase 100 U/mL. ACSF n=9, ATP n=8, ATP + ARL-67156 n=2, ATP + apyrase n=4, 5-HT n=11, 5-HT + ARL-67156 n=9 and 5-HT + apyrase n=6. Both ARL-67156 and apyrase reduce microglial response toward a local application of 5-HT or ATP. One way Anova, Tukey's multiple comparisons test; data are represented as mean \pm SEM.

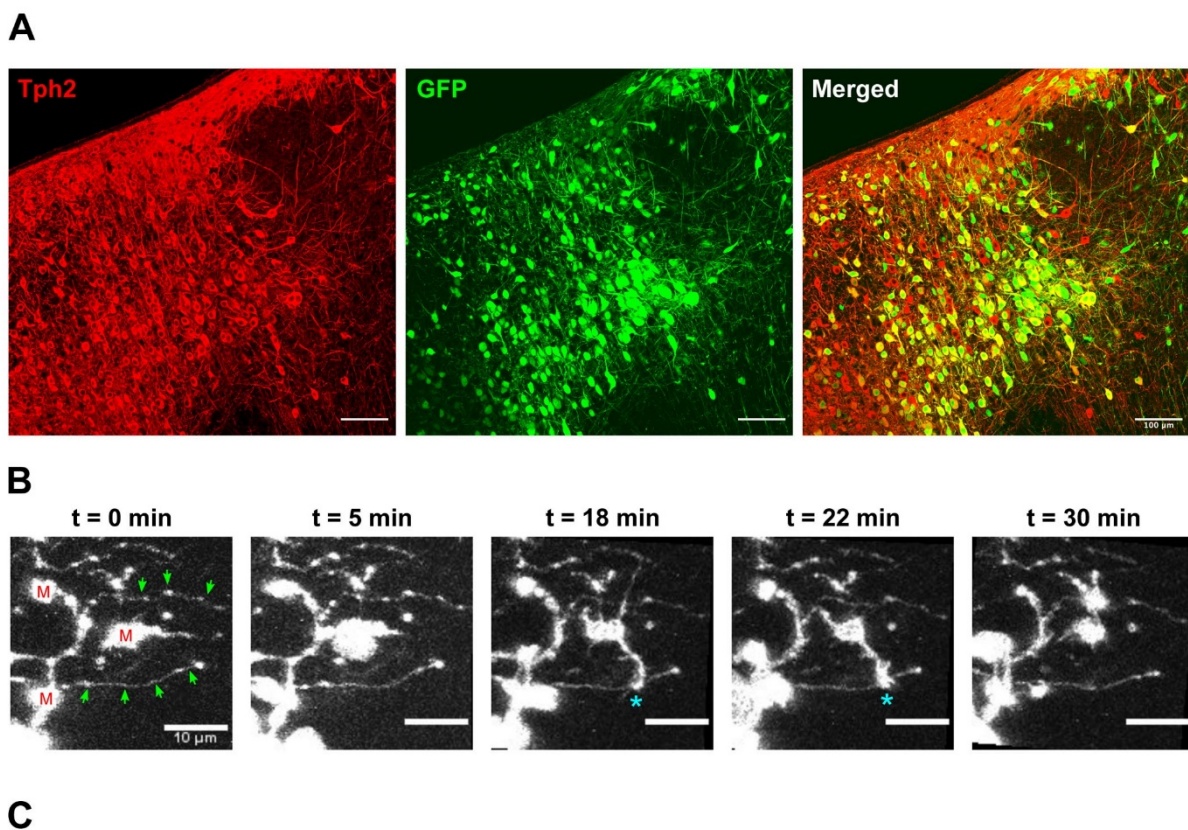


Figure 5: Microglia processes contact serotonergic neuron fibers spontaneously. **(A)** Expression of GFP in serotonergic neurons. Cre-dependant expression of GFP in serotonergic neurons in the raphe of Pet1^{Cre/+}; Cx3cr1^{GFP/+} mice. Immunostaining with an anti-Tph2 antibody was performed to observe serotonergic neurons soma on sagittal slice. Scale bar: 100 μ m. **(B)** Time-lapse showing spontaneous microglia processes interaction with serotonergic neuron fiber over the time by using 2-photon microscopy. The green arrows show serotonergic neuron fibers whereas the red M shows microglia. The blue asterisks show a microglia process interacting with a serotonergic neuron fiber at t = 18 min and t = 22 min only during the 30 min of acquisition.

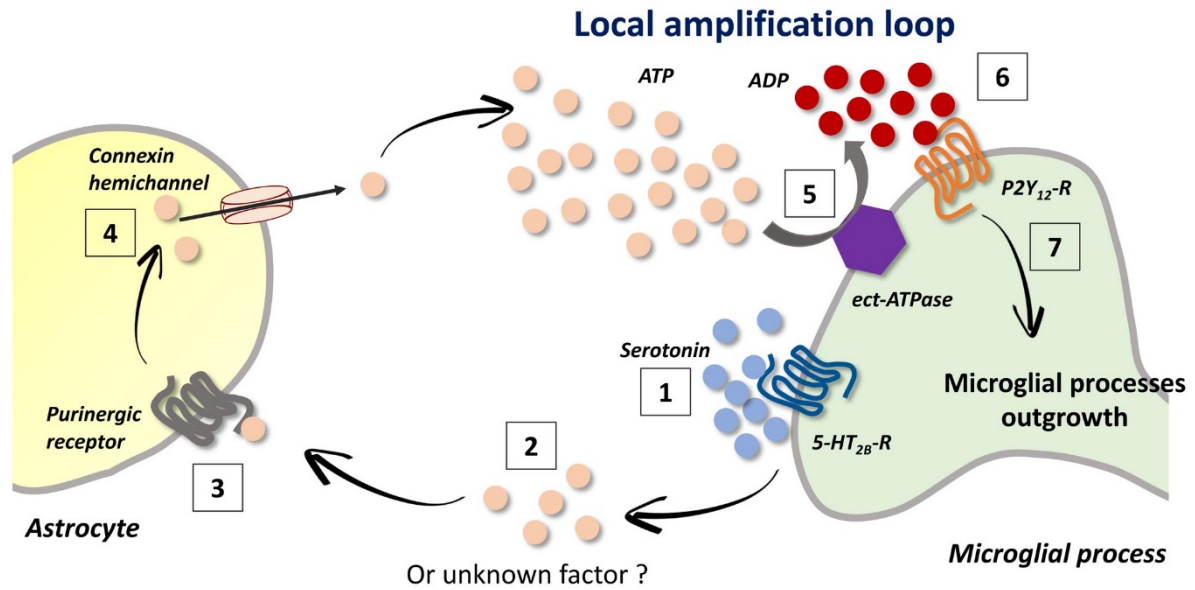
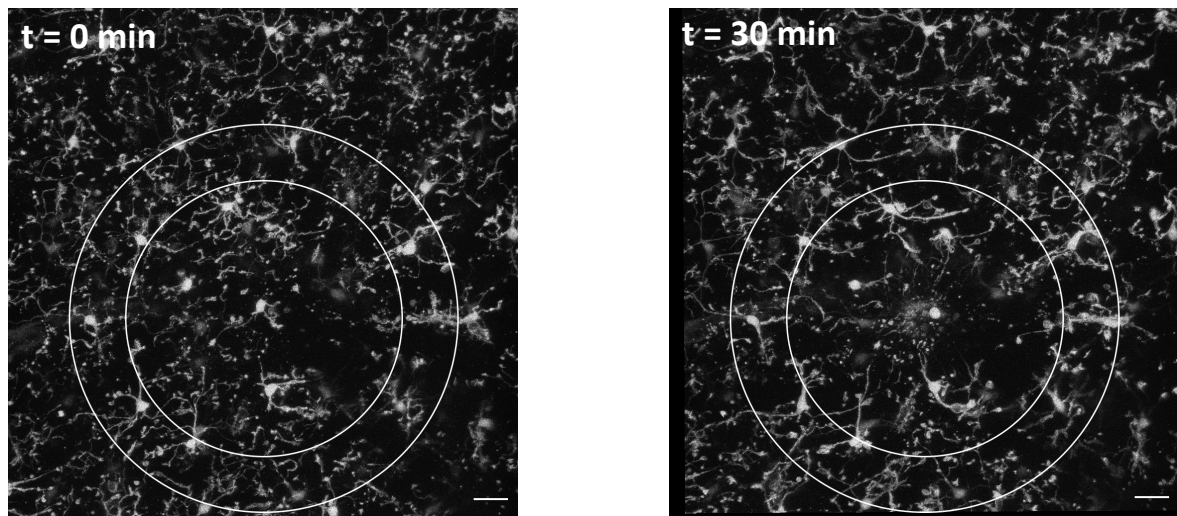


Figure 6: Microglial 5-HT_{2B} receptor, with the help of extracellular ATP/ADP, requires P2Y₁₂ receptor for microglial processes outgrowth toward serotonin. Schematic representation of the involvement of the microglial processes outgrowth toward serotonin involving both microglial 5-HT_{2B} and P2Y₁₂ receptors. Serotonin binds the microglial 5-HT_{2B} receptor (1) leading to a release of ATP, or unknown compounds, by microglia (2) which stimulates a massive release of ATP by astrocyte via a connexin hemichannel (4). This release of ATP by astrocyte provokes an increase of extracellular ATP, which is hydrolyzed in ADP by ecto-ATPase expressed by microglia (5). The last step of this model is the ADP binding to P2Y₁₂ receptor (6) leading to microglial processes outgrowth (7).

SUPPLEMENTARY DATA

A



B

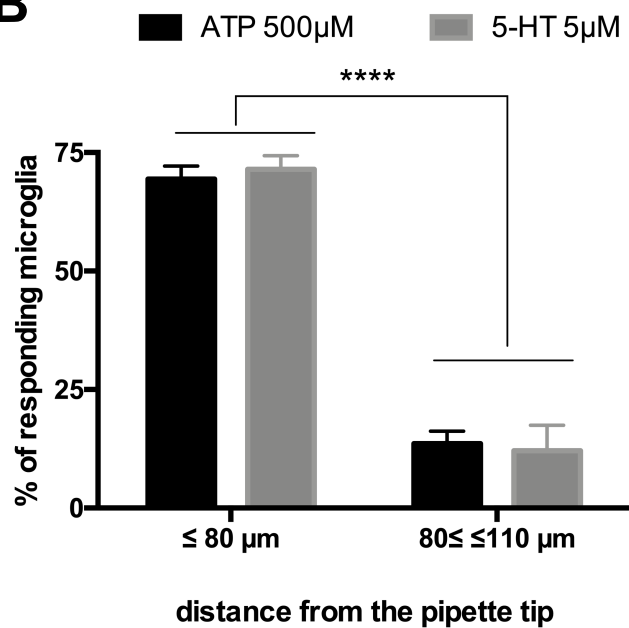


Figure S1: Number of microglia responding to a local application of serotonin or ATP is similar. (A) Microglial responses toward a local application of serotonin at t=0 min (before the compound application) and t=30 min. The white circles represent the 2 areas used to quantify the number of microglia soma which processes grew toward ATP or serotonin. (B) Percentages of microglia responding to ATP or 5-HT in the 160 µm diameter circle or in the 160-225 µm diameterring. n= 13 experiments analysed for ATP and 11 for 5-HT.

**III - Étude de la potentielle dimérisation du
récepteur 5-HT2B avec le récepteur
purinergique P2Y12**

I. Introduction

Les résultats présentés dans le chapitre précédent montrent que le système purinergique, via un gradient d'ATP/ADP extracellulaire et le récepteur P2Y12, est requis en plus du récepteur 5-HT2B microglial pour la croissance orientée des prolongements microgliaux à la sérotonine. L'hypothèse principale de ce mécanisme est la présence d'une boucle d'amplification assurée par les astrocytes qui vont libérer une grande quantité d'ATP dans le milieu extracellulaire à la suite de la stimulation du récepteur 5-HT2B par la sérotonine. Cependant, il existe une deuxième hypothèse, qui pourrait intervenir en complément de la première hypothèse. En effet, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) sont capables de se dimériser pouvant ainsi former des homodimères ou des hétérodimères. Les récepteurs 5-HT2B et P2Y12 étant tous deux des RCPGs, nous avons émis l'hypothèse que le récepteur 5-HT2B puisse fonctionner en hétérodimère avec le récepteur P2Y12. Cela expliquerait les effets très comparables de la sérotonine et de l'ATP sur les prolongements microgliaux, et la dépendance au récepteur P2Y12 pour la signalisation à la sérotonine.

En effet, la plupart des récepteurs sérotoninergiques couplés à des protéines G peuvent se dimériser avec d'autres récepteurs formant soit des homodimères soit des hétérodimères. Dans le cas des hétérodimères, les récepteurs sérotoninergiques peuvent aussi bien s'associer avec d'autres récepteurs sérotoninergiques (Moutkine et al., 2017) qu'avec des récepteurs appartenant à des systèmes de neurotransmission différents, notamment les récepteurs 5-HT2A avec les récepteurs mGluR2 (Fribourg et al., 2011; González-Maeso et al., 2008) ou les récepteurs dopaminergiques D2 (Albizu et al., 2011; Łukasiewicz et al., 2011) (Albizu 2011, Łukasiewicz 2011). L'hétérodimérisation des récepteurs 5-HT2B et 5-HT2C, tous deux couplés à la protéine $G_{\alpha q}$, n'affecte pas le couplage de ces récepteurs. Cependant, la présence du récepteur 5-HT2C altère les propriétés de liaison du récepteur 5-HT2B. Il existe ainsi une dominance unidirectionnelle du récepteur 5-HT2C sur le récepteur 5-HT2B se traduisant par une diminution de l'affinité du récepteur 5-HT2B pour son ligand et donc à l'extinction de la voie

D'autre part, nous savons que le récepteur 5-HT2B est le principal récepteur à la sérotonine exprimé par les microglies (Kolodziejczak et al., 2015) et que ces dernières expriment fortement le récepteur P2Y12 (Haynes et al., 2006). Il a été montré que, dans des cellules COS-7 et dans les neurones sérotoninergiques, le récepteur 5-HT2B est couplé à la protéine $G_{\alpha q}$ et active la PLC permettant ainsi la production d'IP3. D'autre part, le récepteur P2Y12 est couplé à la protéine $G_{\alpha i/o}$ dans les microglies et son activation par l'ATP ou l'ADP inhibe l'adénylate cyclase provoquant une diminution d'AMPc dans ces cellules (**Figure 22**).

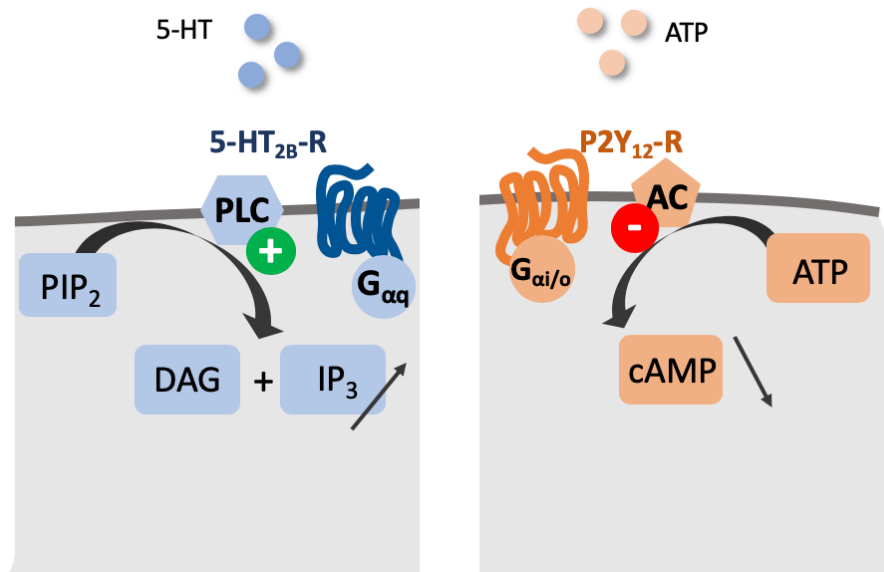


Figure 22: Principale voie de signalisation des récepteurs 5-HT_{2B} et P2Y₁₂ après stimulation respective à la 5-HT et à l'ATP. La stimulation à la 5-HT du récepteur 5-HT_{2B}, étant couplé à une protéine G_{αq}, induit l'activation de la PLC permettant l'augmentation d'IP₃ intracellulaire. Concernant le récepteur P2Y₁₂, couplé à une protéine G_{αi/o}, la stimulation avec l'ATP induit une inhibition de l'adénylate cyclase amenant à une diminution de la concentration d'AMPc.

Nous avons montré que le récepteur P2Y₁₂ est requis pour l'attraction des prolongements microgliaux à la 5-HT. Nous avons posé deux hypothèses afin de comprendre comment la signalisation purinergique était impliquée dans ce mécanisme : la 1^{ère} hypothèse est basée sur le rôle d'ATP ou ADP extracellulaire libérés par les microglies et/ou les astrocytes après stimulation à la sérotonine, détaillée dans l'article précédent. La 2^{ème} hypothèse est celle de la formation d'un hétérodimère entre les récepteurs 5-HT_{2B} et P2Y₁₂, et la stimulation de ce dimère par la 5-HT favoriserait la signalisation du récepteur P2Y₁₂ au lieu de celle du récepteur 5-HT_{2B} (Figure 23).

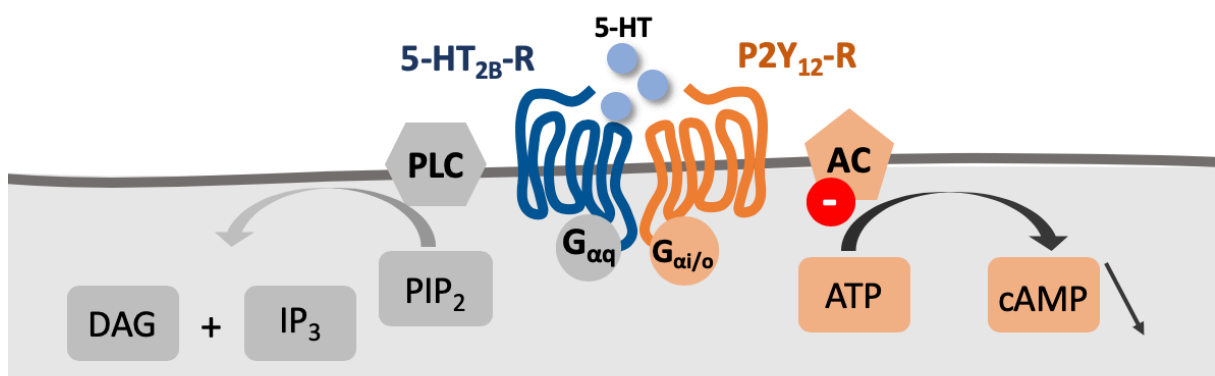


Figure 23: Modèle hypothétique de la dimérisation du récepteur 5-HT_{2B} avec le récepteur P2Y₁₂. L'hétérodimérisation de ces récepteurs impliquerait leur rapprochement à la membrane et la stimulation avec de la 5-HT favoriserait la voie de signalisation du récepteur P2Y₁₂, éventuellement au détriment de celle du récepteur 5-HT_{2B}. La stimulation de ce complexe par la 5-HT inhiberait donc l'adénylate cyclase, réduisant ainsi la concentration intracellulaire d'AMPc dans la cellule.

II. Notions de pharmacologie expérimentale

Il existe plusieurs types d'expériences permettant d'étudier les propriétés pharmacologiques des récepteurs. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à deux notions différentes :

- La détermination de l'affinité d'un récepteur pour son ligand (K_d , K_i)
- La détermination de l'efficacité de couplage d'un récepteur de type RCPG

1. Détermination de l'affinité d'un récepteur pour son ligand (K_d , K_i)

Les expériences de saturation de radioligand permettent de déterminer précisément l'affinité d'un récepteur pour ce ligand. Cependant, tous les agonistes ou antagonistes ne sont pas disponibles sous forme de radioligand, il est donc nécessaire de réaliser une compétition de liaison entre un radioligand à une concentration fixe (ici la mésulergine tritée, H^3 -Mésulergine) avec des concentrations croissantes de ligand non radioactif dit « froid », ici la 5-HT. Plus la concentration de ligand froid sera forte, plus celui-ci va déplacer le ligand radioactif de son site de fixation.

La liaison totale est extrapolée à partir de la quantité maximale de radioligand lié (sans ligand froid) par rapport à la quantité totale de radioactivité incubée et l'affinité du récepteur pour ce radioligand. La liaison non-spécifique est ici déterminée par la quantité de radioactivité encore liée après l'incubation de la concentration la plus forte du ligand froid. Le B_{max} correspond alors à la différence entre la liaison maximale et la liaison non-spécifique (**Figure 24**).

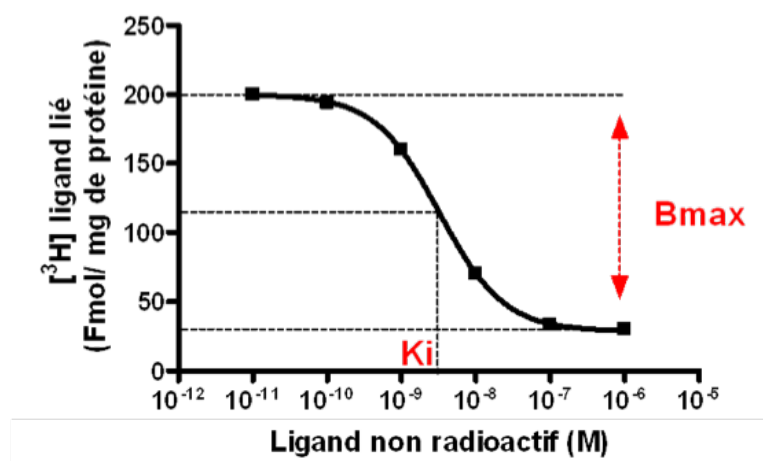


Figure 24: Compétition de liaison de radioligand. Utilisation d'un radioligand mis en excès avec une concentration croissante du ligand d'intérêt non radioactif (exprimée en M). Ce dernier va entrer en compétition avec le ligand radioactif et va le déplacer de son site de liaison. Détermination du K_i (M) correspondant à l'affinité du récepteur pour le ligand non radioactif et du B_{max} (fmole / mg de protéine).

Les données de liaison obtenues par le compteur de radioactivité sont généralement en coup par minute (CPM) ou en désintégration par minute (DPM). Les DPM tiennent compte de la valeur des CPM en fonction du rendement du compteur. La normalisation des DPM obtenus par [l'activité spécifique du radioligand (en Ci/mmol) x 2.22] et la quantité de protéines (mg) permet la conversion de la radioactivité en fmole de radioligand. Les valeurs d'affinité obtenues pour le ligand froid – résultant de l'inhibition de la liaison du ligand radioactif par compétition – sont des concentrations molaires (M) alors que le B_{max} est exprimé en fmole/mg de protéine.

Ces expériences de compétition de liaison ont été réalisées sur des préparations membranaires : les cellules sont lysées afin d'obtenir la quantité totale des récepteurs (surface + retenus dans les compartiments intracellulaires). Cependant, ces expériences peuvent aussi être réalisées sur des cellules entières, intactes et encore vivantes, afin d'obtenir seulement la quantité de récepteurs de surface.

2. Détermination de l'efficacité de couplage d'un récepteur (EC50)

a) Définition de l'EC50 et principe de mesure

Pour étudier l'efficacité du couplage d'un récepteur à une voie $G_{\alpha q}$, G_s ou $G_{\alpha i}$ en réponse à un agoniste, on doit déterminer l'EC50, c'est-à-dire la dose d'agoniste nécessaire pour obtenir la moitié du maximum possible d'activation de cette voie avec l'agoniste. L'intensité de l'activation induite est mesurée en se basant par exemple sur les seconds messagers de la signalisation. Pour la voie $G_{\alpha q}$, qui active la PLC, on peut quantifier la quantité d'IP, un produit de dégradation de l'IP3 stabilisé en présence de Lithium. Pour la voie $G_{\alpha i}$, qui inhibe l'Adénylate Cyclase, on peut mesurer la diminution d'AMPc, dont on aura au besoin artificiellement augmenté le niveau initial. Ces expériences sont réalisées dans des cellules exprimant le ou les récepteurs d'intérêt, et stimulées avec des doses croissantes d'agoniste du récepteur à tester. Pour mesurer les seconds messagers, nous avons utilisé des kits spécifiques de la voie de signalisation $G_{\alpha q}$ et $G_{\alpha i}$ permettant de détecter respectivement la production respective d'IP et d'AMPc dans les cellules. La détection repose sur le principe du transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET).

b) Principe de la détection des seconds messagers par FRET : exemple pour la mesure de l'efficacité du couplage $G_q/PLC/IP3$

Pour la voie $G_{\alpha q}$, l'activation d'un récepteur couplé à $G_{\alpha q}$ par des concentrations croissantes d'agonistes augmente l'activité de la PLC et la libération d'IP3 à partir du PIP2 donc la quantité d'IP1, produit de dégradation de l'IP3 (**Figure 25A**). Une fois les cellules activées, elles sont lysées et on ajoute aux lysats correspondant aux différentes conditions d'activation une dose fixe d'IP1 déjà couplé à un fluorophore accepteur, d2 (IP1-d2 accepteur), ainsi que des anticorps anti-IP1 couplés au cryptate, un fluorophore donneur. Lorsqu'un IP1-d2 interagit avec

un anticorps, le rapprochement du d2 (accepteur de fluorescence) et du cryptate (donneur) permet un transfert de fluorescence, que l'on mesure pour chaque échantillon (**Figure 25B**).

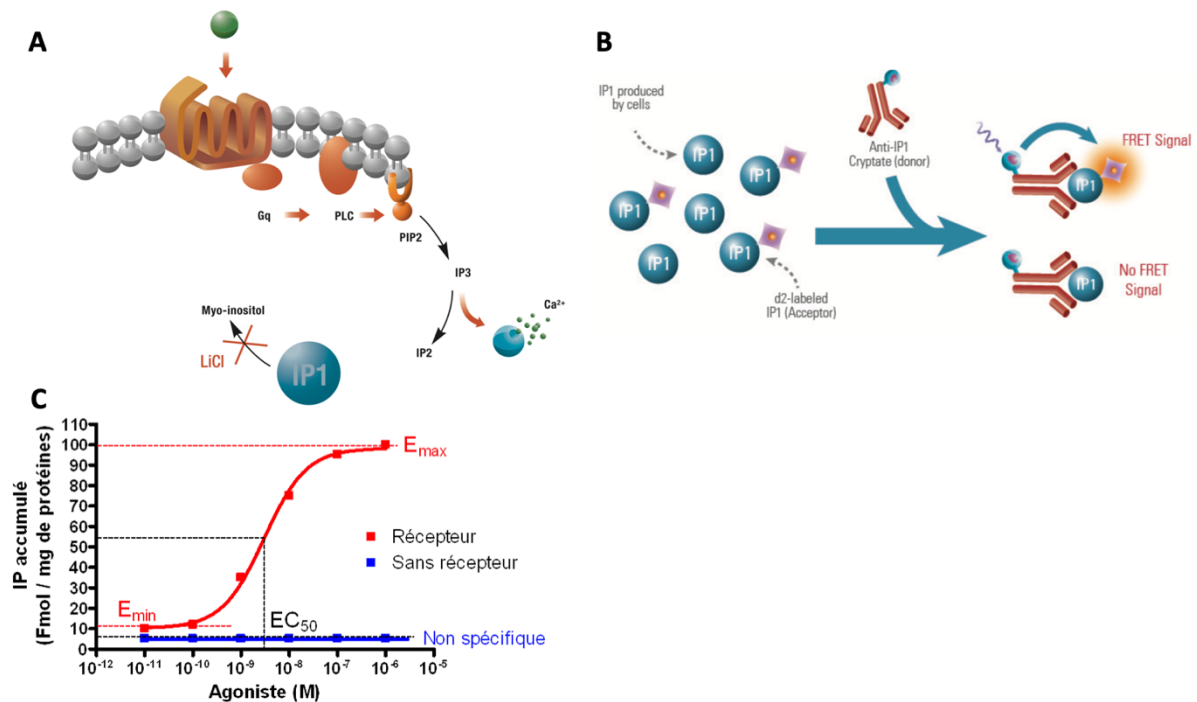


Figure 25: Détermination du couplage d'un récepteur à la voie $G_{\alpha q}$ -PLC-IP3. (A) Principe de la quantification. Les cellules activées produisent de l'IP3 qui est dégradée et s'accumulent sous forme d'IP1, car l'addition de Lithium empêche sa dégradation en inositol. (B) Après lyse des cellules, la quantité d'IP1 présente est déterminée indirectement par liaison à un anticorps anti-IP1 lié au cryptate, en présence d'une quantité fixe d'IP1 lié à un fluorophore accepteur d2 (IP1-d2). En effet, la liaison de l'IP1-d2 à l'anticorps permet un signal FRET, donc plus la quantité d'IP1 produite par les cellules est élevée, plus le signal FRET est diminué, par compétition pour la liaison à l'anticorps. La diminution du signal FRET est ensuite convertie en quantité d'IP1 produite. (C) Représentation de la quantité d'IP accumulée dans les cellules (en fmol / mg de protéine) en réponse à une stimulation avec des concentrations croissantes d'agoniste. Le signal non spécifique correspond à la quantité d'IP1 détectée dans des cellules n'exprimant pas le récepteur d'intérêt. E_{min} correspond à l'activité constitutive du récepteur (plus l'activité non spécifique). L' EC_{50} est la concentration d'agoniste permettant d'atteindre un niveau d'IP égal à la moitié de $E_{max} - E_{min}$.

En absence de stimulation, la réponse obtenue correspond à l'efficacité minimale du couplage (E_{min}) qui reflète l'activité basale intrinsèque du récepteur. La stimulation des récepteurs par des concentrations croissantes d'agoniste produit alors une courbe dose-réponse qui sature lorsque tous les récepteurs sont activés. Le plateau ainsi obtenu correspond à l'efficacité maximale (E_{max}) et la concentration d'agoniste nécessaire à l'obtention de 50% de l'efficacité maximale moins l' E_{min} est l' EC_{50} (**Figure 25C**).

Pour la voie $G_{\alpha i}$, la stimulation de cette voie doit conduire à une diminution de la quantité d'AMPC. Les cellules sont incubées avec de l'IMBX, inhibiteur des phosphodiésterases qui sinon dégraderaient l'AMPC, et si besoin, avec de la forskoline, qui active l'adénylate cyclase et permet d'avoir un niveau initial d'AMPC suffisant pour voir une diminution suite à l'activation des récepteurs d'intérêt. Ceci n'est pas nécessaire si les cellules ont un niveau basal d'AMPC suffisamment élevé, même sans traitement.

III. Co-expression des récepteurs 5-HT2B et P2Y12 dans des cellules COS-7

Afin d'étudier l'hypothèse que le récepteur 5-HT2B fonctionnerait en dimère avec le récepteur P2Y12, nous avons utilisé des cellules COS-7, une lignée cellulaire de type fibroblaste issue de tissu rénal de singe. Cette lignée cellulaire est facile à transfecter contrairement aux cultures de microglies. Afin de co-exprimer les récepteurs 5-HT2B et P2Y12 dans ces cellules, nous avons utilisé deux plasmides différents. Le plasmide permettant d'exprimer le récepteur 5-HT2B (pCAG-Htr2B-HA) était déjà disponible dans le laboratoire, et j'ai construit avec l'aide d'Imane Moutkine le plasmide permettant d'exprimer le récepteur P2Y12. Brièvement, nous avons amplifié le gène codant pour ce récepteur à partir d'ADN complémentaire (ADNc) d'un tissu exprimant fortement le gène d'intérêt (ici le cerveau de souris) puis nous l'avons inséré dans un plasmide permettant de faire une protéine fusion avec une étiquette « Flag » pour obtenir finalement un plasmide pCAG-P2Y12-Flag. Nous avons ensuite simplement ou doublement transfecté des cellules COS-7 avec les plasmides codant ces récepteurs.

Dans un premier temps, nous avons vérifié par immunohistochimie l'efficacité de transfection et la bonne expression de ces deux récepteurs dans les cellules COS-7. Une observation qualitative nous permet d'affirmer que ces deux récepteurs s'expriment dans ces cellules (Figure 26).

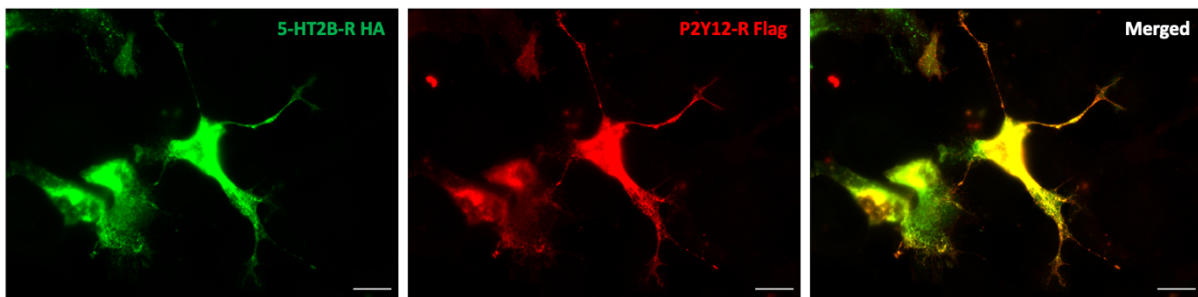


Figure 26: Immunohistochimie sur des cellules COS-7 transfectées avec les plasmides codant les récepteurs 5-HT2B-HA et P2Y12-Flag. Un anticorps Rabbit anti-HA (1/500^e) a été utilisé afin de marquer le récepteur 5-HT2B puis révélé avec un anticorps secondaire Donkey anti-Rabbit Alexa 488 (1/200^e). Un anticorps Mouse anti-Flag (1/500^e) a été utilisé afin de marquer le récepteur P2Y12 puis révélé avec un anticorps secondaire Donkey anti-Mouse Cy3 (1/200^e). Barre d'échelle : 20 μ m. Les cellules transfectées expriment les deux constructions.

IV. Détermination de l'affinité du récepteur 5-HT2B pour la 5-HT en présence du récepteur P2Y12

Afin d'étudier l'effet de la co-expression du récepteur P2Y12 dans les cellules COS-7 sur l'affinité du récepteur 5-HT2B pour la 5-HT, nous avons réalisé des expériences de compétition de liaison d'un radioligand pour le récepteur 5-HT2B. Nous avons utilisé comme

radioligand la Mésulergine tritiée (H^3 -Mésulergine), la mésulergine étant un ligand du récepteur 5-HT2B. Les expériences de compétition de liaison montrent que, dans les cellules transfectées pour exprimer le récepteur 5-HT2B seul ou avec le récepteur P2Y12, plus la concentration de 5-HT augmente, plus celle-ci déplace la liaison de la mésulergine au récepteur 5-HT2B, visible par les courbes sigmoïdes descendantes (**Figure 27A**). A l'aide de ces courbes sigmoïdales, nous avons pu déterminer le K_i pour les deux conditions de transfection. Six expériences indépendantes ont été faites, et les moyennes des K_i du récepteur 5-HT2B pour la sérotonine ont été calculées dans les deux conditions de transfection (**Figure 27B**). La conclusion est que la co-expression du récepteur P2Y12 n'affecte pas l'affinité du récepteur 5-HT2B pour la 5-HT (5-HT2B seul, $K_i = 13,93 \pm 6,722$ nM ; 5-HT2B+P2Y12, $K_i = 9,653 \pm 1,960$ nM) (**Figure 27B**).

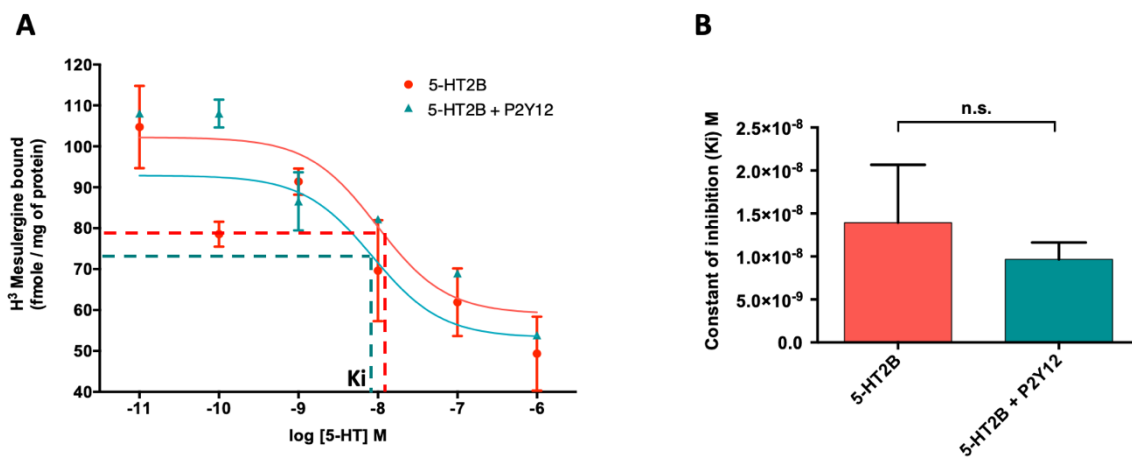


Figure 27: La co-expression du récepteur P2Y12 dans les cellules COS-7 ne modifie pas l'affinité du récepteur 5-HT2B pour la 5-HT. (A) Étude de l'affinité du récepteur 5-HT2B pour un de ses ligands, la 5-HT, par saturation entre un radioligand, la H^3 -Mésulergine et une concentration croissante de 5-HT dans des cellules COS-7 simplement transfectées avec le plasmide codant le récepteur 5-HT2B-HA ou doublement transfectées avec les plasmides codant les récepteurs 5-HT2B-HA et P2Y12-Flag. (B) La détermination des K_i pour chaque condition à partir du graphique (A) ne montre pas de changement dans l'affinité du récepteur 5-HT2B pour la 5-HT, en présence ou non du récepteur P2Y12. Résultats (moyenne \pm SEM) issus de 6 expériences indépendantes, $p = 0,5546$ Unpaired t-test.

V. Détermination du couplage du récepteur 5-HT2B en présence du récepteur P2Y12

Bien que la co-expression du récepteur 5-HT2B avec le récepteur P2Y12 dans des cellules COS-7 n'affecte pas l'affinité de la liaison de la 5-HT au récepteur 5-HT2B, nous avons par la suite étudié si la coexpression du récepteur P2Y12 pouvait affecter le couplage du récepteur 5-HT2B. Pour ce faire, nous avons quantifié la production d'IP ou d'AMPC après stimulation avec de la 5-HT de cellules simplement ou doublement transfectées, en suivant le protocole décrit **Figure 25**. Brièvement, les cellules COS-7 sont stimulées pendant 60 minutes

avec des concentrations de 5-HT (de 10^{-11} à 10^{-6} M) puis lysées. Les lysats cellulaires sont ensuite incubés avec les anticorps d2 et cryptate pendant 30 à 60 minutes et les ratios HTRF sont ensuite mesurés. On observe, aussi bien dans les cellules COS-7 simplement transfectées avec le récepteur 5-HT2B ou doublement transfectées avec les récepteurs 5-HT2B et P2Y12, une augmentation de la production d'IP lorsqu'on augmente la concentration de 5-HT (**Figure 28A**). Les courbes sigmoïdes obtenues nous permettent de déterminer l'efficacité du couplage du récepteur 5-HT2B à la protéine $G_{\alpha q}$, par détermination de l'EC₅₀, or celui-ci n'est pas modifié en présence du récepteur P2Y12 (EC₅₀ = $5,302 \pm 3,774$ nM) par rapport aux cellules COS-7 simplement transfectées avec le récepteur 5-HT2B (EC₅₀ = $7,247 \pm 2,457$ nM) (**Figure 28B**).

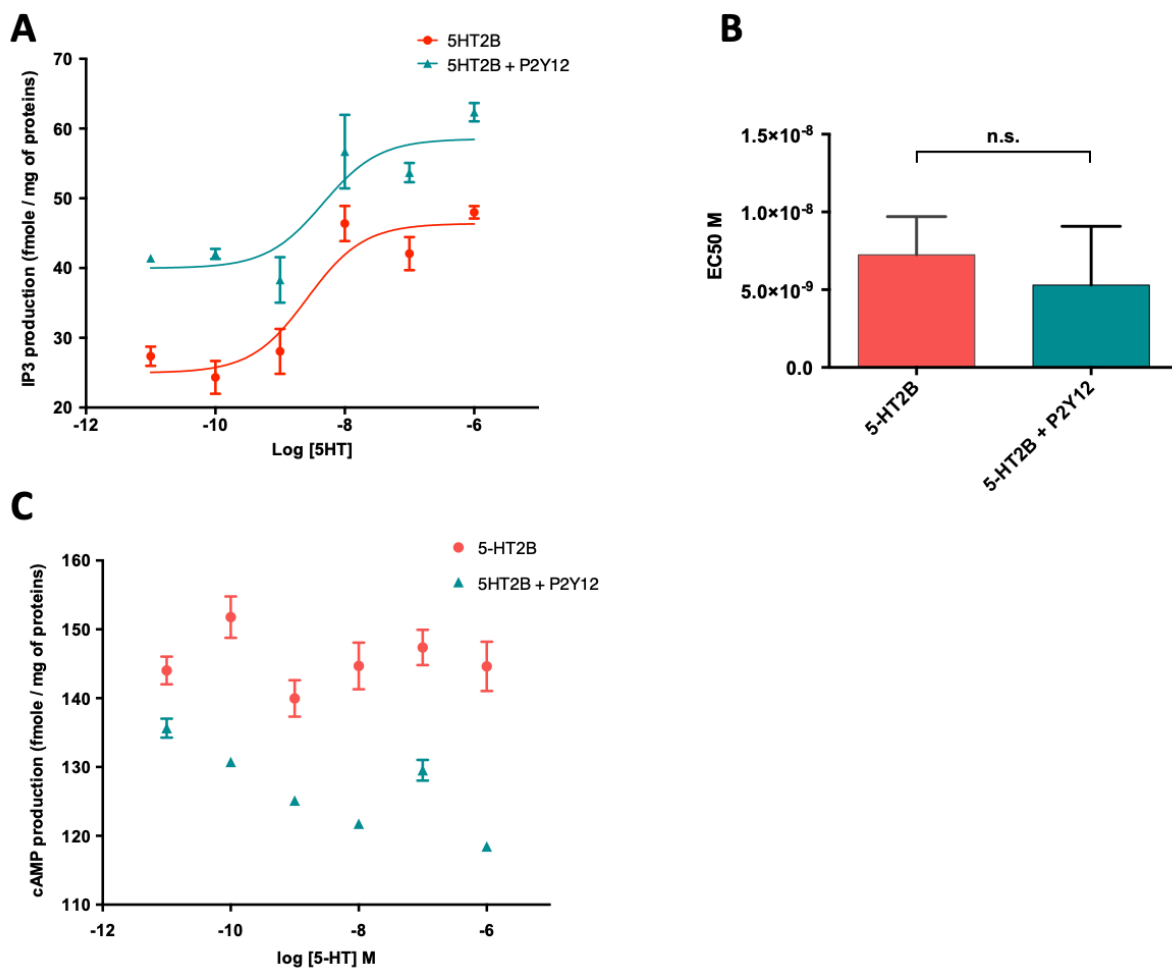


Figure 28: La co-expression du récepteur 5-HT2B avec le récepteur P2Y12 ne change pas le couplage du récepteur 5-HT2B après stimulation à la sérotonine dans des cellules COS-7. (A) Quantité d'IP produite (en fmole / mg de protéines) en réponse à une concentration croissante de 5-HT dans des cellules COS-7 exprimant le récepteur 5-HT2B (rouge) ou les récepteurs 5-HT2B et P2Y12 (bleu). (B) L'efficacité (EC₅₀) du récepteur 5-HT2B pour la 5-HT n'est pas modifiée en présence du récepteur P2Y12 ($p = 0,6771$, Unpaired t-test). (C) Quantité d'AMPc (en fmole / mg de protéines) dans les cellules simplement (5-HT2B, rouge) ou doublement (5-HT2B et P2Y12, bleu) transfectées, après traitement par des concentrations croissantes de 5-HT.

Bien que le couplage du récepteur 5-HT2B à la voie de signalisation de l'IP3 ne soit pas modifié, nous avons voulu ensuite tester si le fait de co-exprimer le récepteur P2Y12 avec le récepteur 5-HT2B pouvait permettre à la sérotonine seule, en l'absence d'ATP, de transactiver le récepteur P2Y12 et donc d'activer la voie $G_{\alpha i}$, qui est la voie connue de couplage du récepteur P2Y12. Nous avons donc testé si la sérotonine pouvait faire diminuer la quantité d'AMPc dans les cellules exprimant les deux récepteurs. Dans ces expériences, afin de pouvoir observer une diminution d'AMPc, nous stimulons les cellules préalablement avec de la forskoline, qui active préalablement l'adénylate cyclase, ce qui permet d'augmenter le niveau de base d'AMPc dans les cellules. Nous avons observé que dans les COS-7 simplement transfectées avec le récepteur 5-HT2B, la stimulation avec des doses croissantes de 5-HT n'induisait pas de dose réponse dans la production d'AMPc. Ce résultat est conforme à nos attentes, car un couplage du récepteur 5-HT2B à une protéine G_i n'a jamais été décrit. De même, nous n'observons pas de dose réponse dans les cellules COS-7 co-transfectées avec le récepteur P2Y12, donc la coexpression de ce dernier avec le récepteur 5-HT2B n'est pas suffisante pour induire un couplage du récepteur 5-HT2B à la voie $G_{\alpha i}$ (**Figure 28C**).

IV - La fabuleuse histoire des DREADD dans les microglies

I. Introduction

Une inflammation périphérique, un stress aigu ou chronique, l'état de conscience (veille/sommeil/ anesthésie), peuvent moduler l'expression de certains gènes et la morphologie des cellules microgliales simultanément dans différentes voir toutes les régions du cerveau. Des variations de la libération de sérotonine, dont les axones sont présents avec une forte densité dans tout le cerveau, pourraient également induire des changements de l'état d'activation des microglies, et réguler des fonctions intégrées comme le sommeil et la mémoire.

Au début de ma thèse, un des principaux objectifs était donc de mettre au point un système permettant de mimer l'effet de la sérotonine sur les microglies ou plus généralement de modifier leur état d'activation, à distance et de façon contrôlée dans le temps. Pour ce faire, nous avons prévu d'utiliser les outils chemogénétiques que sont les récepteurs DREADD (Designed Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs). Il existe plusieurs types de récepteurs DREADD qui se distinguent par leur couplage : le récepteur hM3Dq est couplé à une protéine $G_{\alpha q}$ tandis que le récepteur hM4Di est quant à lui couplé à une protéine $G_{\alpha i}$. Ces récepteurs sont des récepteurs de type muscarinique qui ont été modifiés et sélectionnés (« designed receptor ») afin de ne plus reconnaître l'acétylcholine, mais d'être « exclusivement activables » par des composés pharmacologiques (les « designer drugs ») théoriquement sans cible endogène et donc sans effet sur l'organisme (pour revue (Roth, 2016)). Le ligand activateur recommandé et le plus utilisé est la Clozapine-N-oxide (CNO) (**Figure 29**). Cependant, d'autres composés peuvent activer les DREADDs comme la perlapine, le DREADD agoniste 21 (D21) (Thompson et al., 2018), et la clozapine qui est sans doute l'activateur le plus efficace mais possède des propriétés sédatives et antipsychotiques connues (Joshi et al., 2017).

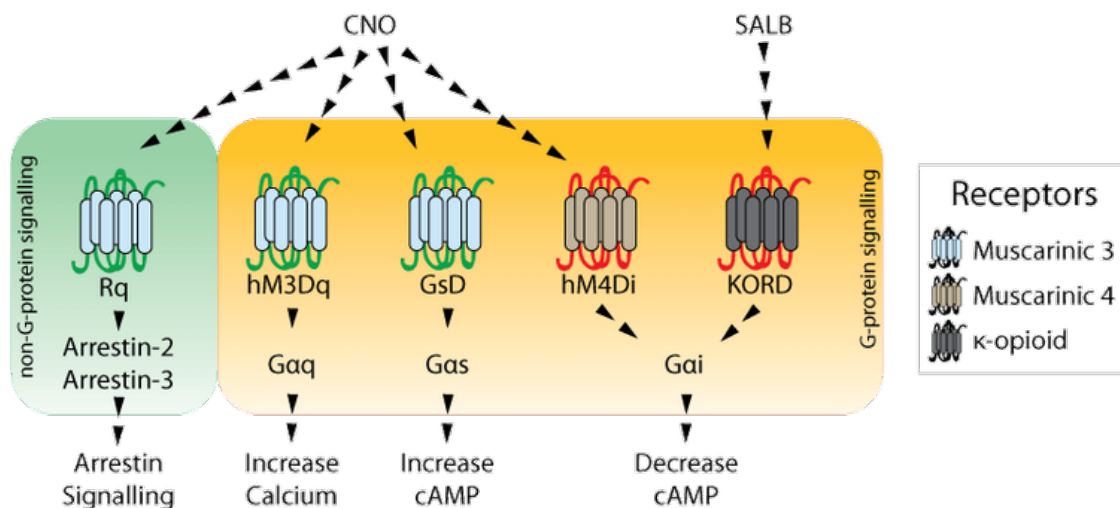


Figure 29: Schéma des différents récepteurs DREADD et leur signalisation. Il existe cinq différents types de récepteurs DREADD (Rq, hM3Dq, GsD, hM4Di et KORD) qui ont été génétiquement modifiés de façon à diminuer le site de liaison pour leurs ligands naturels tout en permettant la liaison de la Clozapine-N-oxide (CNO) ou de la Salvinorine B (SALB), ligands exogène inerte pour l'organisme. Les récepteurs Rq, hM3Dq et GsD sont dérivés des récepteurs muscariniques de type 3 humain, le récepteur hM4Di des récepteurs muscariniques de type 4 humain et le récepteur KORD des récepteurs κ -opioïdes.

D'autre part, ces récepteurs possèdent un tag-HA à l'extrémité de leur partie N-terminale, donc extracellulaire, permettant de vérifier leur bonne expression par utilisation d'anticorps dirigé contre le tag-HA lors d'immunohistochimie.

En théorie, des microglies exprimant les récepteurs DREADD sont modulables à distance et de façon contrôlée dans le temps grâce à l'injection intrapéritonéale de CNO ou d'autre ligand, qui agirait au bout de vingt minutes et pendant quelques heures.

II. Expression des récepteurs DREADD spécifiquement dans les microglies

Comme les récepteurs 5-HT2B sont couplés à priori à la protéine $G_{\alpha q}$, nous avons d'abord cherché à exprimer des récepteurs hM3Dq dans les microglies. Pour cela, nous avons croisé des souris exprimant la CreER recombinase inducible dans les microglies avec des souris portant le gène floxé hM3Dq. Les animaux sont traités avec du tamoxifène à la naissance entre P1 et P5 afin d'induire l'activité de la CreER permettant la recombinaison et donc l'expression du récepteur hM3Dq dans les microglies (**Figure 30**).

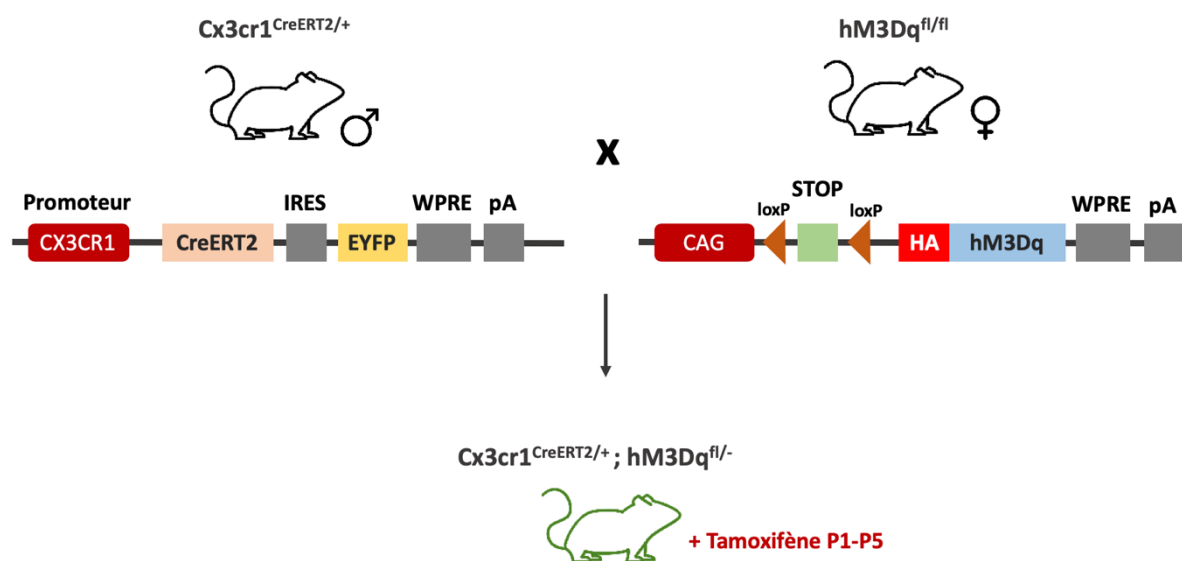


Figure 30: Génération des souris exprimant le récepteur hM3Dq spécifiquement dans les microglies. La recombinaison est sous le contrôle du promoteur *Cx3cr1*, donc dans le cerveau elle n'est exprimée que dans les microglies. Il s'agit d'une recombinaison fusionnée au domaine d'adressage du récepteur aux œstrogènes (ER) modifié pour reconnaître le tamoxifène mais pas les œstrogènes, elle n'est donc fonctionnelle qu'en présence de tamoxifène, qui permet sa relocalisation nucléaire donc la recombinaison et l'expression du récepteur DREADD. Le gène codant le récepteur hM3Dq est précédé d'un codon STOP entouré de sites loxP qui sont excisés en présence de la Cre recombinase, permettant ainsi l'expression du récepteur hM3Dq. Ce dernier est fusionné à la protéine de surface tag-HA. Dans ces expériences, le tamoxifène est injecté juste après la naissance (3 injections intragastriques entre P1 et P5) (Parkhurst et al., 2013; Pitulescu et al., 2010).

Afin de vérifier la bonne expression du récepteur hM3Dq dans les microglies, nous avons perfusé et fait un marquage anti-HA sur des souris $Cx3cr1^{CreERT2/+}; hM3Dq^{fl/-}$ à P30 qui avaient

été traitées au tamoxifène à la naissance (**Figure 31**). A la vue de ces immunohistochimies, on observe tout d'abord un marquage YFP principalement cytoplasmique qui se traduit par une forte expression de la YFP dans le soma et plus faible au niveau des prolongements microgliaux, qui sont peu visibles ici. D'autre part, le marquage du tag HA est faible et ponctué. La superposition de ces deux marquages nous montre que seule une petite partie des cellules exprimant la Cre recombinase (marquage via la YFP endogène) est positive tag-HA positive. S'agissant d'une analyse qualitative, pour vérifier le pourcentage de cellules Cre recombinase positives exprimant le récepteur hM3Dq, des analyses quantitatives sont nécessaires et peuvent être faite par cytométrie en flux (FACS).

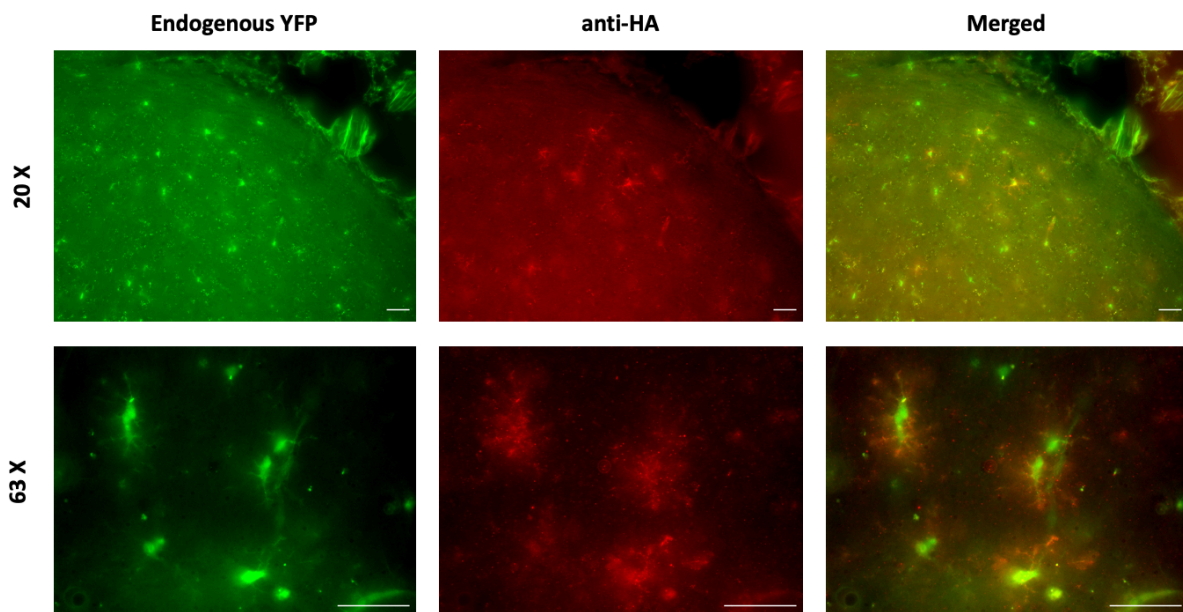


Figure 31: Vérification de l'expression des récepteurs DREADD hM3Dq dans les microglies par immunohistochimie. Des souris $Cx3cr1^{CreERT2/+}; hM3Dq^{fl/-}$ ont été perfusées avec du paraformaldéhyde 1 mois après le traitement au tamoxifène puis des tranches de 50 μm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un vibratome. Les microglies, via la CreER, expriment la YFP de façon endogène (vert). Pour visualiser les récepteurs hM3Dq, une immunohistochimie a été réalisée avec un anticorps Rabbit-anti-HA-Tag (1/500^e) et révélé avec un anticorps secondaire Donkey anti-Rabbit Cy3 (1/500^e). Des images ont été acquises au 20 X et au 63 X. Barre d'échelle : 20 μm .

III. Effets des ligands des DREADD sur la motilité des microglies

Pour tester la fonctionnalité des récepteurs DREADD dans les microglies, nous avons étudié si leur activation modulait la motilité des prolongements microgliaux. En effet, le récepteur DREADD de type hM3Dq étant couplé à la protéine $G_{\alpha q}$, comme le récepteur 5-HT2B, on s'attend à ce que sa stimulation locale induise une croissance orientée des prolongements. Bien que la Clozapine-N-oxide (CNO) soit le ligand le plus couramment utilisé pour l'activation des récepteurs DREADD, il existe d'autres agonistes tels que la clozapine, la perlapine et le DREADD agoniste 21 (D21). Nous avons donc testé l'effet de l'activation, par

ces différents ligands, du récepteur hM3Dq exprimé par les microglies, sur la motilité des prolongements microgliaux, par imagerie bi-photonique sur tranches aigües de cerveau, selon le protocole détaillé de (Etienne et al., 2019).

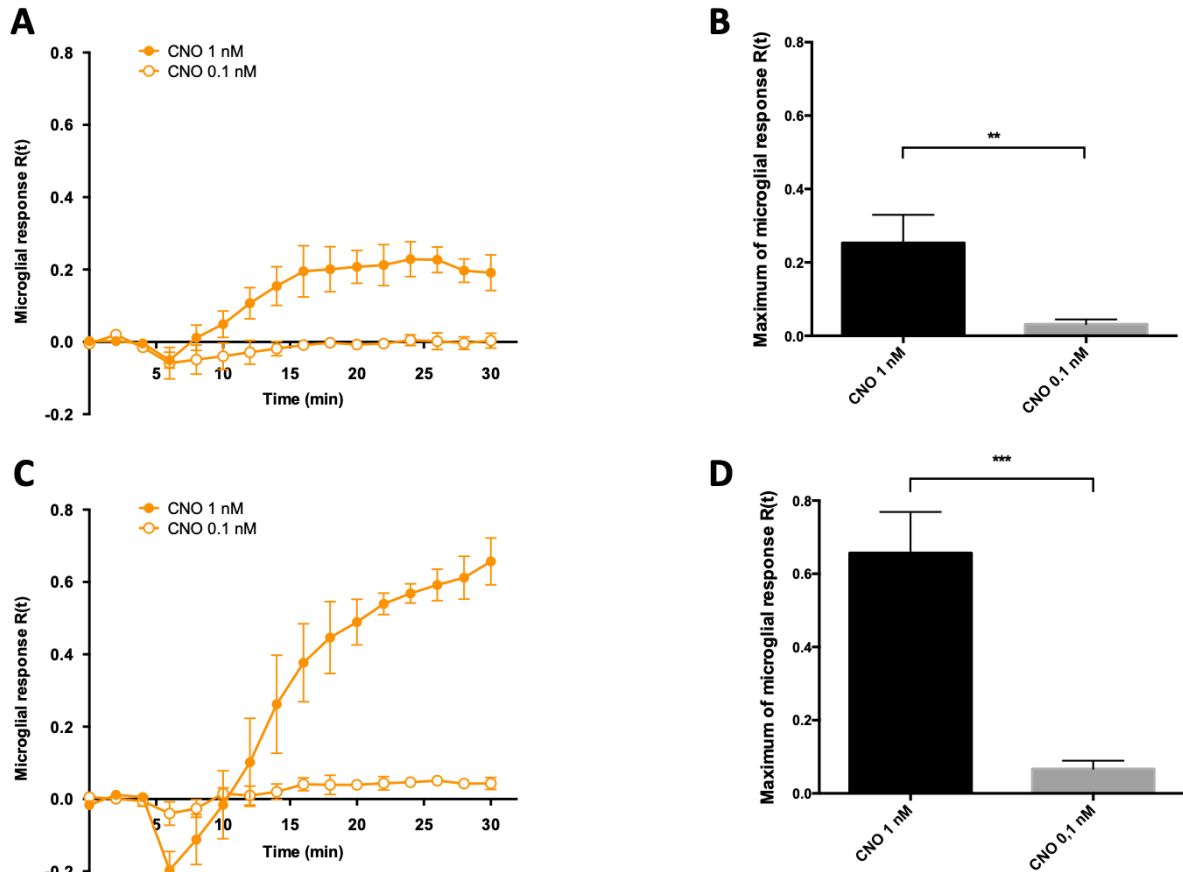


Figure 32: L'application du CNO induit la croissance orientée des prolongements des microglies dans des souris exprimant le récepteur hM3Dq dans les microglies mais également dans des souris sauvages. (A) Le CNO à 1 nM induit la croissance orientée des prolongements des microglies dans des tranches aigües de cerveau de souris exprimant le récepteur hM3Dq dans les microglies, mais cet effet n'est plus observé lorsque la concentration de CNO est abaissée à 0,1 nM. (C) L'application locale de CNO à 1 nM induit une réponse microgliale dans des tranches de cerveau de souris n'exprimant pas les récepteurs hM3Dq. (B) Quantification de la réponse microgliale maximal R_{max} pour les souris $Cx3cr1^{CreERT2/+}; hM3Dq^{fl/-}$ (D) et les souris $Cx3cr1^{GFP/+}$.

Dans un premier temps, nous avons appliqué localement le CNO sur des tranches aigües de cerveau de souris exprimant les récepteurs hM3Dq dans les microglies ($Cx3cr1^{CreERT2/+}; hM3Dq^{fl/-}$). Nous avons ainsi observé une réponse microgliale $R(t)$ lors de l'application de ce ligand à une concentration de 1 nM mais cet effet disparaît lorsque la concentration de ces ligands est abaissée à 0,1 nM (**Figure 32A, B**). Par la suite, afin de réaliser les contrôles négatifs de cette expérience, nous avons appliqué localement le CNO, à des concentrations identiques, sur des tranches aigües de cerveau de souris n'exprimant pas les récepteurs hM3Dq (souris $Cx3cr1^{GFP/+}$). De façon surprenante, nous avons de nouveau observé une réponse microgliale à l'application locale de CNO à 1 nM (**Figure 32C, D**). Ainsi, bien que le CNO soit décrit dans la littérature comme étant un composé inerte en l'absence de l'expression des récepteurs

DREADD, il induit des modifications morphologiques des microglies par extension et attraction des prolongements microgliaux.

Le CNO est le ligand le plus couramment utilisé pour activer les récepteurs DREADD tels que les récepteurs hM3Dq et hM4Di, cependant il existe d'autres ligands faisant partie de la famille des antipsychotiques (clozapine et perlapine) et de leurs dérivés (DREADD agoniste 21, D21). Nous avons donc testé ces composés sur dans tranches aigües de cerveau de souris sauvages, n'exprimant les récepteurs hM3Dq, afin de vérifier l'effet des autres ligands sur la motilité des microglies et dans le but de sélectionner un ligand inerte pour notre étude. Cependant, nous avons constaté le même effet attractant pour la clozapine, la perlapine et le D21 à des concentrations faibles (1 nM) (**Figure 33**).

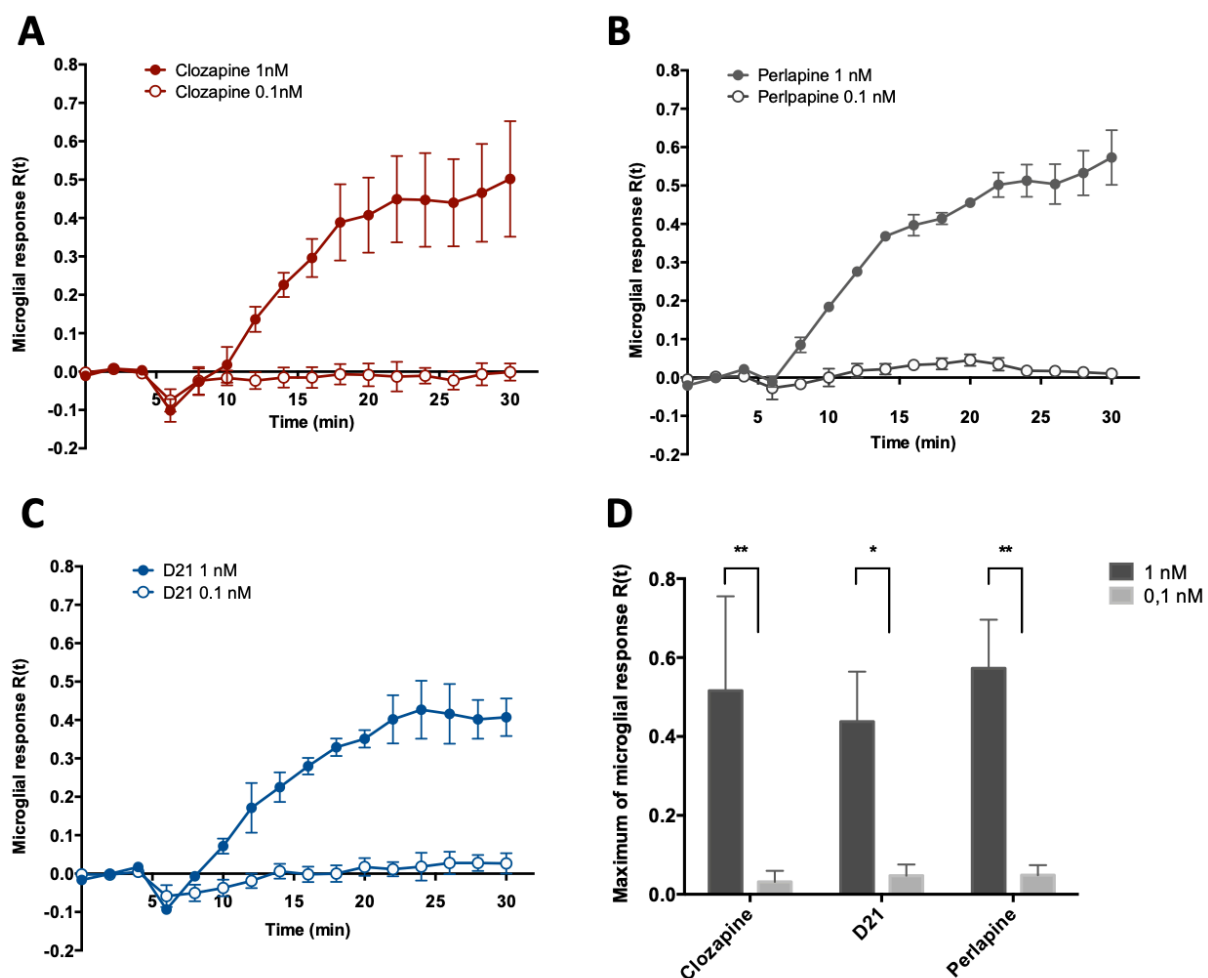


Figure 33: Les différents ligands des récepteur hM3Dq induisent une attraction des prolongements microgliaux en l'absence d'expression de ces récepteurs. (A) La clozapine, (B) la perlapine, et (C) le D21 induisent une réponse microgliale R(t) quand ils sont appliqués à une concentration de 1 nM. (E) Quantification de cette réponse pour une concentration des ligands à 1 nM ou 0,1 nM.

Ces résultats démontrent que les ligands des récepteurs DREADD induisent une attraction des prolongements des microglies, même en absence de l'expression de ces récepteurs. Cependant, considérant l'intérêt thérapeutique de la Clozapine, connue pour être un antipsychotique atypique, nous nous sommes intéressés à l'effet de cette molécule sur les microglies, encore peu connu à l'heure actuelle. D'autre part, la Clozapine, comme les antipsychotiques atypiques, agit sur les récepteurs à la sérotonine de type 2 (R-5-HT2) et notamment agit en tant qu'agoniste inverse des récepteurs 5-HT2A (Vanover et al., 2004), dont sa structure est proche de celle du récepteur 5-HT2B.

IV. Rôle du récepteur 5-HT2B dans la réponse microgliale à la Clozapine

Bien que la Clozapine soit capable de se lier à divers récepteurs tels que les récepteurs sérotoninergiques, dopaminergiques et histaminiques, cette molécule possède une forte affinité pour le récepteur 5-HT2B ($K_i = 7,57 \pm 1,03$ nM, (Wainscott et al., 1996)). Compte-tenu de nos résultats montrant que l'activation de ce récepteur par la sérotonine induit une croissance orientée des prolongements microgliaux, nous nous sommes demandé s'il était aussi impliqué dans l'effet morphologique de la clozapine. Nous avons donc testé l'effet d'une application locale de Clozapine sur des tranches aigües de cerveau de souris n'exprimant pas le récepteur 5-HT2B dans les microglies (souris conditionnelles knock-out, cKO). Nous avons constaté qu'en l'absence de ce récepteur dans les microglies, la Clozapine n'induisait plus de croissance orientée des prolongements microgliaux (dans les cKO, augmentation de l'intensité du signal à proximité de la pipette $R_{max} = 0,02129 \pm 0,01073$ vs dans les souris contrôles cWT $R_{max} = 0,2723 \pm 0,02494$) (**Figure 34 A-B**).

Cette réponse étant similaire à celle de la 5-HT, présentée et étudiée dans la partie II et montrant l'implication du récepteur P2Y12 dans cette réponse, nous avons voulu savoir si la réponse microgliale à la Clozapine suivait le même mécanisme que la réponse à la 5-HT. Pour ce faire, par des moyens pharmacologiques, nous avons bloqué soit le récepteur 5-HT2B avec le RS 127445 ou soit le récepteur P2Y12 avec le PSB 0739 puis nous avons quantifié la réponse microgliale à la 5-HT. Les résultats obtenus confirment l'hypothèse que les deux récepteurs microgliaux 5-HT2B et P2Y12 sont nécessaires à l'attraction des prolongements des microglies vers la Clozapine (**Figure 34 C-D**).

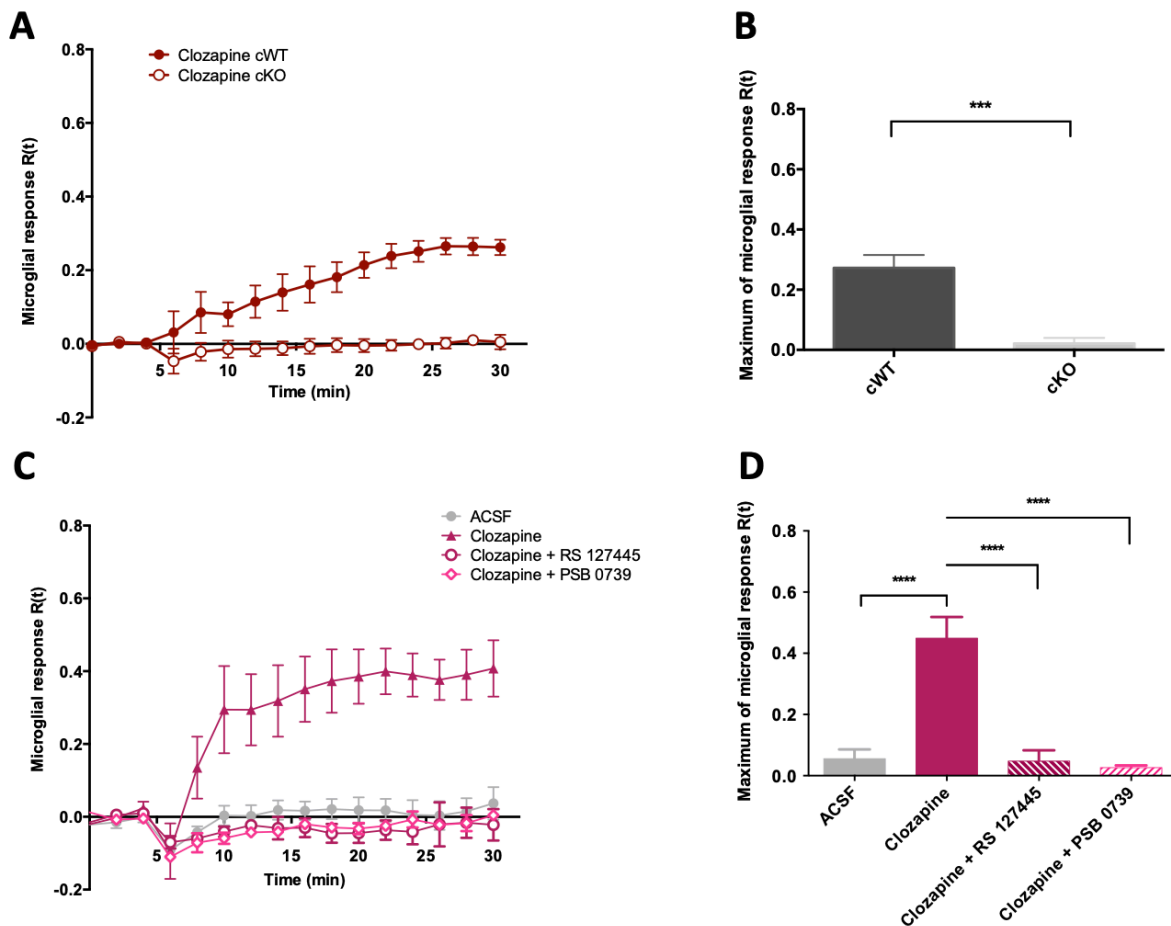


Figure 34: La réponse microgliale R(t) est médiée aussi bien par le récepteur 5-HT_{2B} microgliale que par le récepteur P2Y₁₂. (A-B) La délétion du récepteur 5-HT_{2B} spécifiquement dans les microglies empêche l'attraction des prolongements microgliaux vers une application locale de Clozapine. ***p = 0,0008, Unpaired t test, n = 3. (C-D) L'utilisation d'inhibiteurs sélectifs tels que le RS 127445 pour bloquer le R-5-HT_{2B} ou le PSB 0739 pour bloquer le R-P2Y₁₂ empêchent la réponse microgliale à la Clozapine. ****p < 0,0001, One-Way ANOVA, Holm-Sidak's test, n = 3.

La clozapine étant un antipsychotique couramment utilisé en clinique dans le traitement de la schizophrénie ou des troubles bipolaires, nous nous sommes demandés si son action sur les microglies *via* le récepteur 5-HT_{2B} participe à ces effets antipsychotiques. Pour observer ceci, nous avons induit un modèle de psychose chez la souris en utilisant du MK-801, qui est un antagoniste des récepteurs NMDA provoquant une hyperlocomotion chez la souris. Il est alors attendu que la clozapine, dans ce modèle, contrecarre les effets du MK-801 empêchant ainsi l'induction d'une hyperlocomotion chez les souris.

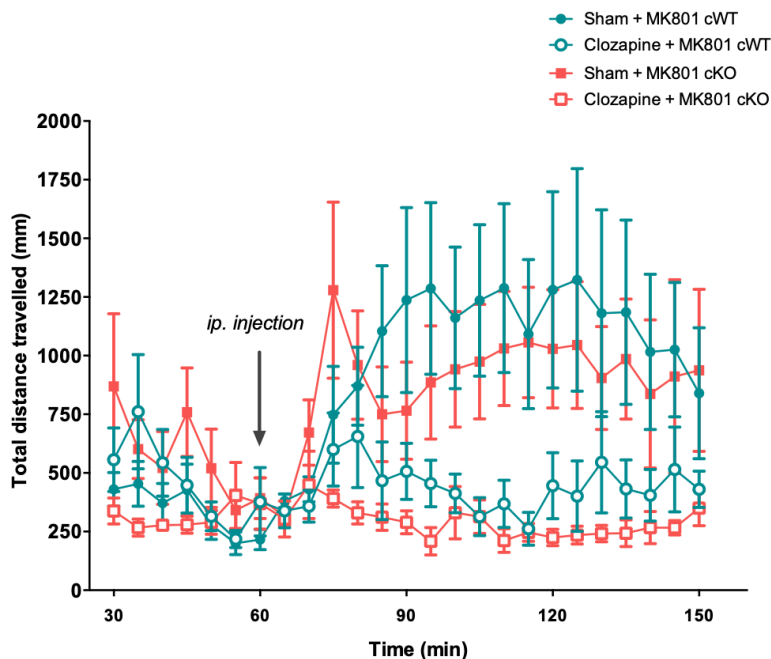


Figure 35: Aucun effet du récepteur 5-HT2B microglial sur l'activité antipsychotique aiguë de la Clozapine. 60 minutes après l'habituation à l'open-field (seules les 30 premières minutes sont affichées ici) des souris de différents génotypes ont reçu une double injection intrapéritonéale de MK-801 (0,5 mg/kg) avec de la Clozapine (1 mg/kg) ou de la solution saline à volume égal (Sham). Le MK-801 augmente immédiatement la locomotion des souris co-injectées avec une solution saline, mais cet effet est bloqué par la co-injection de Clozapine avec le MK-801, dans les deux génotypes. $n = 6$ par groupe, 2-Way ANOVA réalisé entre le temps $t = 60$ min et $t = 150$ min, et résultats non significatifs entre les deux génotypes.

Nous avons observé que les souris dépourvues de récepteur 5-HT2B microglial répondaient à la Clozapine de la même manière que les souris contrôles : dans les deux génotypes, la clozapine inhibe l'effet hyper-locomoteur du MK-801 (**Figure 35**).

Ces résultats démontrent que chez la souris, la Clozapine possède un effet attracteur sur les prolongements des microglies, dépendant du récepteur 5-HT2B microglial et du récepteur P2Y12. Cependant, son effet « antipsychotique » ne dépend pas du récepteur 5-HT2B microglial chez la souris. Des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer l'impact de la clozapine, et des antipsychotiques atypiques de manière générale, *via* le récepteur 5-HT2B sur les microglies et quelles fonctions microgliales peuvent être modulées par la clozapine.

DISCUSSION

Les travaux effectués au cours de ma thèse ont permis de caractériser le rôle de la sérotonine sur la modulation de la motilité des cellules microgliales. Grâce aux différents outils à disposition tels que les lignées de souris transgéniques permettant une délétion spécifique du récepteur 5-HT_{2B} dans les microglies, j'ai ainsi montré que la sérotonine, appliquée localement, induit une croissance orientée des prolongements microgliaux *via* l'activation en synergie des récepteurs microgliaux 5-HT_{2B} et P2Y₁₂. J'ai également observé des contacts spontanés et transitoires des prolongements microgliaux avec les axones des neurones sérotoninergiques. Enfin, j'ai mis en évidence un effet des antipsychotiques atypiques tels que la Clozapine sur la motilité des microglies, alors que ces cellules ne sont habituellement pas étudiées comme des cibles de ces médicaments.

Cette discussion reprend les résultats principaux obtenus au cours de ma thèse et présente les perspectives qu'ils ouvrent, ainsi que les questions qu'ils ont soulevées et des propositions d'expérience pour y répondre. Je présenterai, pour finir, une conclusion générale sur l'importance de l'étude du rôle de la sérotonine sur la modulation des différentes fonctions microgliales.

La croissance orientée des prolongements microgliaux induite par la sérotonine requiert un gradient extracellulaire d'ATP/ADP et l'activation des récepteurs P2Y₁₂

L'émergence des techniques d'imagerie telles que la microscopie à deux photons a contribué à la découverte de la motilité des prolongements microgliaux, à la fois dans un contexte normal (surveillance) et en réponse à une modification locale de l'environnement, comme une lésion induite par un laser (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). Dans le deuxième cas, on observe une croissance orientée ou « motilité directionnelle » des prolongements vers la zone lésée, et il a été montré que celle-ci dépendait du récepteur P2Y₁₂ (qui détecte l'ATP et, encore mieux, l'ADP) (Haynes et al., 2006), et pouvait être mimée par l'application locale d'ATP (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). Le laboratoire a également observé une croissance orientée des prolongements microgliaux à la suite d'une application locale de 5-HT, sur des tranches aigües de cerveau de souris, et montré qu'elle était inhibée en présence d'antagonistes des récepteurs 5-HT_{2B} (Kolodziejczak et al., 2015). Ces récepteurs sont exprimés par les microglies, mais aussi par des neurones sérotoninergiques et dopaminergiques (Diaz et al., 2012; Doly et al., 2017), et un des objectifs de ma thèse a été de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans cet effet de la sérotonine sur les microglies. J'ai ainsi montré que l'induction de la motilité directionnelle par la sérotonine est dépendante du récepteur 5-HT_{2B} microglial, mais aussi du récepteur P2Y₁₂ *via* de l'ATP/ADP extracellulaire. Le mode d'action de la sérotonine est donc différent de celui du glutamate, qui induit aussi une croissance orientée, mais *via* l'activation des récepteurs NMDA sur les neurones qui libèrent en retour de l'ATP (Dissing-Olesen et al., 2014). Dans notre cas, c'est bien le récepteur microglial de la sérotonine qui initie la réponse. Cependant, mes résultats montrent aussi qu'il faut qu'un gradient d'ATP, ou plus précisément d'ADP issu de la dégradation d'ATP, s'établisse car si on abolit ce gradient avec de l'apyrase ou un inhibiteur d'ecto-nucléotidases, on n'observe plus de réponse à la sérotonine. Il nous reste donc à déterminer comment se forme le gradient d'ATP/ADP extracellulaire après la stimulation par

la sérotonine. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle des astrocytes dans la formation, l'amplification ou l'entretien d'un gradient d'ATP. Par exemple, la croissance orientée des prolongements microgliaux vers une lésion est abolie lorsqu'on bloque les hémicanaux de connexines, présents sur les astrocytes mais pas ou peu sur les microglies, qui permettent la libération d'ATP (Davalos et al., 2005). Par ailleurs, lors d'une activation par LPS, les microglies libèrent rapidement de faibles quantités d'ATP dans le milieu extracellulaire et celui-ci, en se liant sur les récepteurs P2Y1 des astrocytes, induit à son tour une libération plus importante d'ATP par les astrocytes (Pascual et al., 2012). Nous pensons que, d'une manière similaire, les astrocytes jouent un rôle dans la formation d'un gradient local d'ATP, après stimulation des microglies par la 5-HT. Les microglies agiraient sur les astrocytes *via* une petite libération d'ATP (comme dans (Pascual et al., 2012) ou d'un autre facteur non identifié. Des expériences sont actuellement en cours dans le laboratoire pour tester notre hypothèse : des cultures primaires de microglies et d'astrocytes, pures ou réunies, sont stimulées avec de la sérotonine et on mesure la quantité d'ATP présente dans le surnageant dans les minutes qui suivent. Nous nous attendons à observer une nette augmentation de la concentration d'ATP après stimulation à la sérotonine des co-cultures microglies/astrocytes, mais pas après stimulation des astrocytes purs, et peu ou pas après stimulation des microglies pures.

Ces résultats nous permettraient ainsi de valider l'hypothèse que la sérotonine, via la stimulation du récepteur 5-HT_{2B} microglial, induit la mise en place d'un gradient d'ATP/ADP extracellulaire par les astrocytes, permettant l'activation du récepteur P2Y₁₂ des microglies et la croissance orientée de leurs prolongements.

Le récepteur 5-HT_{2B} est couplé à une protéine G_{αq} dans des cellules COS transfectées et dans les neurones sérotoninergiques. Mais qu'en est-il dans les microglies ?

Pour comprendre comment la sérotonine induit, dans les microglies, la croissance des prolongements ou d'autres effets comme la maturation vers un phénotype plus ou moins réactif (voir l'article de Béchade et al en annexe), il est important de connaître la cascade de signalisation intracellulaire du récepteur 5-HT_{2B} dans les microglies. Depuis plusieurs années, les travaux de Luc Maroteaux sur ce récepteur ont permis de caractériser sa structure, sa pharmacologie et ses différentes fonctions. Chez la souris, le récepteur 5-HT_{2B} a été détecté aussi bien en périphérie (cœur, poumon, estomac, rein, intestin) que dans le cerveau (Choi and Maroteaux, 1996), et plus précisément dans les fibroblastes (Jaffré et al., 2009), les cardiomyocytes (Nebigil et al., 2001), les neurones sérotoninergiques, les neurones dopaminergiques (Diaz et al., 2012; Doly et al., 2017) et les cellules microgliales (Kolodziejczak et al., 2015). Cependant, le couplage du récepteur 5-HT_{2B} n'a été déterminé que dans certains types cellulaires. Dans des cellules transfectées et dans les neurones sérotoninergiques, le récepteur 5-HT_{2B} est couplé à une protéine G_{αq}, mais nous ne connaissons pas le couplage de ce récepteur dans les cellules microgliales *in vivo*. En se basant sur les signalisations de ce récepteur dans d'autres cellules (**Figure 20**), plusieurs voies peuvent être envisagées et testées :

- La voie de la Phospholipase C (PLC) : IP3, phospho-Akt et Ca²⁺
- La voie des MAP Kinases : phospho-ERK
- La voie de NFκB

Pour cela, on peut réaliser des cultures primaires de microglies et les stimuler avec de la sérotonine ou du BW723C86, un agoniste sélectif du récepteur 5-HT2B et les étudier. L'activation de la PLC sera quantifiée indirectement par mesure de la production d'IP3, selon le principe présenté dans la **Figure 25**. La quantification de la phosphorylation des kinases Akt et ERK1/2 sera faire par Western Blot. Pour la voie NFκB, des microglies cultivées sur des lamelles et activées seront marquées par immunofluorescence pour détecter NFκB et on quantifiera le ratio de la localisation nucléaire par rapport à la localisation cytoplasmique. Si ces expériences sont concluantes, il serait intéressant de les répéter en utilisant cette fois-ci des microglies purifiées à partir de cerveau de souris afin de confirmer la signalisation dans un système plus proche de l'*in vivo*.

Par ailleurs, pour étudier les variations de concentration calcique intracellulaire dans les microglies *in vivo*, nous pourrions utiliser des souris transgéniques exprimant un biosenseur calcique, la protéine GCaMP, spécifiquement dans les microglies et, sur des tranches aigües de cerveau, libérer localement de la sérotonine et mesurer l'augmentation de fluorescence par microscopie bi-photonique. Ce système aurait l'avantage, par rapport aux autres, d'être plus proche des conditions où l'on voit un effet de la sérotonine sur les microglies, mais nécessiterait des souris doublement transgéniques Cx3cr1^{CreERT2/+} ; GCaMP^{fl/fl}, que nous n'avons pas (encore) au laboratoire. De plus, pour être sûrs d'étudier la signalisation du récepteur 5-HT2B et pas indirectement celle du P2Y12, il faudrait faire l'expérience en bloquant le récepteur P2Y12.

Ainsi, d'après ces résultats nous serions en mesure de confirmer, ou d'infirmer, le couplage du récepteur 5-HT2B à la protéine G_{αq} et certaines voies spécifiques dans les microglies.

Les microglies contactent-elles spontanément les fibres sérotoninergiques *in vivo* ?

Les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques sont regroupés dans les noyaux du raphé mais les axones projettent dans toutes les régions du cerveau. Il existe deux types de libération de sérotonine par ces neurones : la libération synaptique, qui se fait au niveau de la terminaison de l'élément présynaptique, et la libération extra-synaptique, présente au niveau somatodendritique et des varicosités axonales. La libération extra-synaptique, définie comme « transmission de volume » (Agnati et al., 1995) permet aux neurotransmetteurs de diffuser jusqu'aux cellules environnantes telles que les microglies – et peut-être d'induire la croissance orientée de leurs prolongements. Cette libération de sérotonine est induite par des potentiels d'action mais aussi lors de l'activité tonique des neurones sérotoninergiques.

Des études récentes du laboratoire ont permis de montrer une proximité parfois très étroite entre des prolongements des microglies et des varicosités de neurones sérotoninergiques *in vivo* (Kolodziejczak et al., 2015). Pour aller plus loin dans cette étude, et déterminer si ces contacts étaient stables ou transitoires, j'ai suivi, par imagerie bi-photonique, les mouvements

de prolongements microgliaux dans des tranches aigües de cerveau de souris dont les neurones sérotoninergiques expriment la GFP. J'ai observé des contacts transitoires entre prolongements et varicosités, mais pour le moment rien ne me permet de savoir si ces contacts sont induits par une libération de sérotonine ou se produisent au hasard.

L'objectif serait maintenant de comprendre dans quel contexte *in vivo* les microglies sont capables de répondre à la sérotonine en « projetant » leurs prolongements. Pour ce faire, nous mettons au point actuellement un protocole utilisant l'optogénétique afin de stimuler la libération de sérotonine par les neurones sérotoninergiques et d'observer le comportement des cellules microgliales. Pour ce faire, nous prévoyons d'injecter un virus Cre recombinase dépendant dans le noyau B7 du raphé dans des souris $Pet1^{Cre/+}$; $Cx3cr1^{GFP/+}$ afin d'exprimer la ChannelRhodopsine (ChR2) fusionnée à la protéine fluorescente rouge mCherry ou GFP (si la fluorescence mCherry est trop faible en microscopie bi-photonique) spécifiquement dans les neurones sérotoninergiques. Une étude utilisant ce virus dans les neurones sérotoninergiques a permis de définir les conditions de stimulation (30 Hertz toutes les 5 millisecondes pendant 30 secondes sur le corps cellulaire ou les axones) permettant de libérer de la sérotonine (Sengupta et al., 2017). En réalisant des tranches sagittales aigües, afin de préserver au maximum l'intégrité des projections neuronales, nous pourrions distinguer les microglies (exprimant la GFP, et motiles) des fibres sérotoninergiques (exprimant la mCherry, et immobiles). Nous comparerons la fréquence des contacts entre les prolongements des microglies et les neurones ou axones sérotoninergiques avant et après stimulation de la ChR2. Si les contacts sont induits par la libération de sérotonine, nous nous attendons à observer une augmentation de leur fréquence après stimulation des fibres ou neurones sérotoninergiques.

En théorie, on pourrait tenter l'approche inverse de diminuer les contacts en réduisant l'activité des neurones sérotoninergiques. En effet, le laboratoire a récemment montré que la délétion du récepteur 5-HT_{2B} dans les neurones sérotoninergiques diminue la fréquence de décharge de ces neurones (Belmer et al., 2018) et donc la libération de sérotonine. Ainsi, la délétion du récepteur 5-HT_{2B} dans les neurones sérotoninergiques pourrait diminuer le nombre de contacts spontanés entre les cellules microgliales et ces neurones. Pour le tester, on pourrait dans un premier temps utiliser une lignée de souris, existant au laboratoire, invalidée pour le gène du récepteur 5-HT_{2B} spécifiquement dans les neurones sérotoninergiques (souris $Pet1^{Cre/+}$; $Htr2b^{fl/fl}$), faire des immuno-marquages pour identifier les microglies et les fibres sérotoninergiques, quantifier leur proximité et la comparer à celle dans des souris wild-type.

Ces résultats permettraient ainsi de montrer que la sérotonine contrôle de manière physiologique la morphologie des microglies, et que cette dernière est donc potentiellement sensible aux variations de l'activité des neurones sérotoninergiques qui se produisent par exemple au cours des phases diurnes et nocturnes ou en réponse à certains traitement antidépresseurs.

Effets des antipsychotiques atypiques tels que la clozapine sur les cellules microgliales

Les récepteurs DREADD sont un outil chimogénétique largement utilisé depuis ces dernières années, notamment dans le domaine des neurosciences (Urban and Roth, 2015). Ces

récepteurs couplés aux protéines G « synthétiques » sont principalement utilisés pour activer ou inhiber de manière ciblée des populations neuronales et/ou des réseaux neuronaux spécifiques dans le cerveau (Matos et al., 2019; Teissier et al., 2015). Il est également possible de moduler l'activité des astrocytes en y exprimant ces récepteurs (Pour revue (Bang et al., 2016; Xie et al., 2015)), Cependant, les DREADDs ont été très peu étudiés dans les cellules microgliales (Grace et al., 2016, 2018).

Dans des souris transgéniques exprimant spécifiquement le récepteurs hM3Dq dans les microglies, j'ai observé que l'application locale de CNO ou d'autres ligands connus des DREADDs tels que la clozapine, la perlapine ou le D21 induisait des modifications morphologiques illustrées par l'attraction des prolongements des microglies. Cependant, quand j'ai réitéré ces expériences sur des tranches aigües de cerveau de souris n'exprimant pas le récepteur hM3Dq, j'ai observé les mêmes effets d'attraction des prolongements des microglies, même à des concentrations faibles des composés (1 nM), et qui disparaissaient en abaissant la concentration à 0,1 nM. Ces résultats, très inattendus, montrent la limite de l'utilisation de ces outils chimogénétiques. En effet, au regard de ces résultats présentés en détails dans le chapitre 4 de la partie résultats, les microglies répondent au moins morphologiquement aux ligands des DREADDs et il est primordial de réaliser les contrôles appropriés lors de chaque expérience afin de s'assurer que les ligands n'ont pas d'effet même en l'absence des récepteurs DREADD.

Par ailleurs, en voulant comprendre comment la clozapine agissait sur la motilité des prolongements des microglies, j'ai montré que son effet était dépendant du récepteur 5-HT2B microglial. Cependant, l'expérience que j'ai réalisée sur des souris invalidées pour le récepteur 5-HT2B microglial et traitées au MK-801 pour mimer une psychose suggère que ce récepteur n'est pas impliqué dans les effets antipsychotiques aigus de la clozapine chez la souris. Les effets potentiels de la régulation des microglies par la clozapine que j'ai mis en évidence sont donc encore à identifier. Une possibilité est que cette régulation pourrait participer à certains effets secondaires de la clozapine au niveau du système immunitaire.

En effet, la Clozapine possède des propriétés immunosuppressives ou anti-inflammatoires aussi bien en périphérie que dans le SNC (Klein et al., 2014; Sugino et al., 2009) : le traitement des souris à la Clozapine empêche la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α , et augmente la production d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire qui permet de diminuer la réponse immunitaire (Sugino et al., 2009). De plus, des études *in vitro* ont montré que la Clozapine protège les neurones dopaminergiques des dommages induits par l'inflammation en inhibant la sur-activation microgliale (Hu et al., 2012). Il serait donc intéressant d'étudier le potentiel rôle du récepteur 5-HT2B dans les effets immunomodulateurs de la Clozapine. Pour cela, on pourrait étudier l'effet de la Clozapine sur le comportement de maladie induit par injection de LPS chez des souris sauvages ou dépourvues de récepteurs 5-HT2B. En effet, la co-injection de Clozapine chez des souris sauvages limite la réponse inflammatoire induite par l'injection de LPS (Klein et al., 2014; Sugino et al., 2009). Chez les souris n'exprimant pas le récepteur 5-HT2B (dans les microglies, ou partout), on s'attendrait donc à une diminution ou une absence d'effet de la Clozapine sur l'inflammation chez ces souris par rapport aux souris sauvages.

Par ailleurs, il est important d'étudier la transduction du signal de la Clozapine *via* le récepteur 5-HT2B. En effet, la Clozapine est connue pour être un antagoniste des récepteurs 5-HT2 pour la voie de signalisation de couplage $G_{\alpha q}$ dans les cellules transfectées. Or dans mes expériences d'application locale sur tranche aigüe, il induit les mêmes effets que la sérotonine, donc se comporte comme un agoniste du récepteur 5-HT2B. Il est connu que les antipsychotiques tels que la Clozapine peuvent se lier sur le récepteur 5-HT2A formant un dimère avec un récepteur mGluR2 et que cette liaison modifie le couplage en activant la voie de signalisation du récepteur mGluR2 (dépendante de $G_{\alpha i}$), au détriment du récepteur 5-HT2A (Fribourg et al., 2011). J'ai observé que la réponse microgliale à la Clozapine était médiée par les deux récepteurs 5-HT2B et P2Y12, qui sont a priori couplés respectivement à $G_{\alpha q}$ et à $G_{\alpha i}$ (**Figure 34**). Il faudrait donc étudier, dans des cellules COS-7, si la coexpression du récepteur P2Y12 modifie, d'une part, l'affinité du récepteur 5-HT2B pour la Clozapine et d'autre part, son couplage après stimulation par la Clozapine. En effet, nous posons l'hypothèse que la coexpression du récepteur P2Y12 va modifier le couplage du récepteur 5-HT2B induit par la Clozapine, en induisant la voie de signalisation du récepteur P2Y12. Si ces résultats se révèlent concluants, des études supplémentaires seront nécessaires afin de vérifier l'interaction entre ces deux récepteurs par co-immunoprécipitation et par transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET).

Conclusion générale

A l'heure actuelle, le rôle de la sérotonine sur les cellules microgliales est encore peu connu. Cependant, les récents travaux du laboratoire confirment la présence d'une modulation des microglies par la sérotonine, via le récepteur 5-HT2B. En effet, durant ma thèse, j'ai ciblé mes recherches sur le rôle de la sérotonine sur la motilité microgliale. Ainsi, nous avons montré que le récepteur microglial 5-HT2B est nécessaire pour la croissance orientée des prolongements microgliaux vers une application locale de sérotonine mais il n'est pas impliqué dans la surveillance microgliale, c'est-à-dire dans les mouvements aléatoires d'extension et de rétraction permettant de surveiller l'environnement. La motilité des prolongements est une fonction essentielle des microglies car nombre de ces fonctions en dépendent telles que la phagocytose, la reconnaissance de lésions et/ou débris cellulaires, et les interactions microglies-neurones permettant l'élagage ou la plasticité synaptique. Il est donc important d'étudier l'implication du récepteur microglial 5-HT2B et de savoir si sa délétion peut impacter ces fonctions.

D'autre part, le système sérotoninergique et les microglies sont tous les deux impliqués dans de nombreuses fonctions cérébrales telles que la régulation du cycle veille/sommeil, la mémoire mais aussi dans les troubles psychiatriques. Ainsi, le laboratoire s'intéresse actuellement aux différents rôles que pourrait avoir le récepteur 5-HT2B microglial dans ces fonctions en observant si la délétion de ce récepteur dans les microglies affecte la mémoire et s'il rend ces souris plus vulnérables à un stress.

Pour finir, les résultats surprenants de la modulation des microglies par les antipsychotiques atypiques ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques. En effet, les effets secondaires et indésirables des traitements des antipsychotiques atypiques sont bien connus mais encore inexpliqués. La compréhension de leur mécanisme permettrait de proposer des traitements alternatifs, ou des co-traitements, pour les contrôler.

ANNEXES

Annexe 1 : Régulation des microglies par les neuromodulateurs

Régulation des microglies par les neuromodulateurs : modulations mélodieuses en modes majeur et mineur

Article de revue soumis le 19 Avril 2019 dans le Journal « Neuroscience Letters » et en cours de révision

1. Contexte

Les cellules microgliales possèdent différents rôles dans le système nerveux central et participent au développement du parenchyme cérébral, au maintien de l'homéostasie du cerveau et sont les premières cellules à répondre à toutes perturbations du SNC. Pour jouer leurs rôles, les microglies ont besoin de détecter et de s'adapter aux modifications de leur environnement, telles que la présence de pathogènes, de débris cellulaires, mais aussi aux changements de l'activité neuronale ou des autres cellules cérébrales. De nombreux neuromodulateurs tels que la sérotonine, dopamine, norépinephrine, acétylcholine et histamine sont synthétisés et libérés par les neurones afin de coordonner l'activité neuronale localement ou de manière plus diffuse selon leur libération. Ces neuromodulateurs peuvent agir par simple diffusion atteignant ainsi des cibles situées à quelques micromètres, nous avons, dans cette revue, étudié le rôle de ces différents modulateurs sur la modulation des cellules microgliales. En effet, les microglies expriment à leur membrane un nombre important de récepteurs dont des récepteurs spécifiques des neuromodulateurs. Cette revue a pour but de résumer les différents modes d'actions des neuromodulateurs sur les microglies à court terme, en ayant agissant sur la motilité de leurs prolongements, leur morphologie, leur activité de phagocytose et leur transition entre différents états d'activation. Pour finir, la dernière partie de cette revue est consacrée aux effets *in vivo* de la modulation des microglies par les neuromodulateurs, notamment au cours du développement du SNC avec la maturation des réseaux neuronaux du système visuel.

2. Contribution personnelle

Dans cette revue, j'ai participé à la rédaction des parties impliquant le rôle de la sérotonine sur les fonctions des microglies.

Regulation of microglia by neuromodulators: melodious modulations in major and minor modes.

Albertini G.^{1,2,3}, Etienne F.^{1,2,3}, Roumier A.^{1,2,3}

¹Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), Institut du Fer-à-Moulin (UMR-S 1270), Paris, France

²Sorbonne Université, Paris, France

³Institut du Fer à Moulin, Paris, France

Corresponding Author:

Anne Roumier (anne.roumier@inserm.fr)

Phone: +33 1 45 87 61 27

E-mail Addresses of the Co-authors:

Giulia Albertini (giulia.albertini@inserm.fr)

Fanny Etienne (fanny.etienne@inserm.fr)

ABSTRACT

Microglial cells, the brain resident macrophages, participate to brain development, function, and help maintaining its homeostasis. To play these roles, they need to detect and adapt to modifications of their environment, like presence of pathogens, cell death, but also to changes in the activity of neurons or other brain cells. The so-called neuromodulators serotonin, dopamine, norepinephrine, acetylcholine and histamine, are compounds which are synthesized and released by specialized neurons to coordinate the activity of other neurons in different regions.

In this review, we will explore the hypothesis that these typical neuromodulators also modulate microglia, as they may act by diffuse, volume transmission and reach targets located a few micrometers away. We will summarize the current evidence that neuromodulators can act on microglia on the short term, by enhancing or reducing their motility, morphology, phagocytic activity, and on the mid-long term, by modulating their transition between different immune activation states. Noteworthy, these regulations can also be exerted by non-neuronal cells able to release neuromodulators, like mast cells. Finally, we will review some recent data suggesting that the regulation of microglia by neuromodulators participate in vivo to some aspects of central nervous system development, function and homeostasis.

KEYWORDS

Microglia; neuromodulators; inflammation; development; norepinephrine; serotonin; acetylcholine; histamine; dopamine; motility; chemotaxis; phagocytosis

ABBREVIATIONS:

5-HT: serotonin

A β : amyloid β peptide

ACh: acetylcholine

AT: angiotensin

ATP: adenosine triphosphate

CNS: central nervous system

dLGN: dorsolateral geniculate nucleus

EGFP: enhanced green fluorescent protein

ERK: extracellular signal-related kinase

GPCR: G protein-coupled receptor

IFN: interferon

IL: interleukin

JAK-STAT: Janus kinase-Signal transducer and activator of transcription

LPS: lipopolysaccharide

MAPK: mitogen-activated protein kinase

mAChRs: muscarinic acetylcholine receptors

nAChRs: nicotinic acetylcholine receptor

PGE₂: prostaglandin E₂

PI3K: PI3 kinase

PKA: protein kinase A

TNF: tumor necrosis factor

Introduction

Microglia cells are the resident tissue macrophages of the central nervous system (CNS). Beside their involvement in the immune response, they have recently been proposed as mediators of CNS development, contributors of CNS homeostasis and functions, and key players during neurodegenerative and psychiatric disorders. To play these roles, they need to detect and adapt to modifications of their environment, like the presence of pathogenic compounds, cell death, but also changes of synaptic and neuronal activity, which often occur globally for groups of neurons. Indeed, to process complex information, the CNS simultaneously coordinates the activity of neurons in several brain areas dedicated to motor, sensory and integrative functions. This complex symphony is conducted by specialized neurons which synthesize the so-called neuromodulators: serotonin (5-HT), dopamine, norepinephrine, acetylcholine (ACh) and histamine, and release them in brain regions to which they make short- and long-range connections. One intriguing hypothesis is that these typical neuromodulators¹ might not only regulate neuronal targets but also attune microglia in harmony. Indeed, in contrast with the neurotransmitters glutamate and γ -aminobutyric acid (GABA), neuromodulators are mainly released from structures not facing differentiated post-synaptic membranes [1–4]. This volume or “diffuse”, asynaptic transmission can reach targets located up to a few micrometers away (reviewed in [5]) and early ultrastructural studies identified glial elements close to sites of neuromodulators release [1,6,7]. To note is that beside neurons, mast cells, which are perivascular cells of immune origin, may also regulate microglia via the release of 5-HT and histamine.

This review aims to provide the major keys to understand how neuromodulators can strengthen or inhibit microglial functions and properties. We will show that neuromodulators can act on the

¹ This definition of neuromodulators excludes adenosine triphosphate (ATP) and endocannabinoids, which have modulatory effects on neurons and microglia, but are not synthesized by specific neurons. Their effects on microglia have been addressed in, for example, [93,94].

short term, by modulating microglia motility, morphology, phagocytic activity, and on the mid and long terms, by driving or modulating their transition between different immune activation states. Finally, we will discuss some recent data suggesting that these regulations participate *in vivo* to CNS development, function and homeostasis.

1. The regulation of microglia by neuromodulators is allowed by spatial vicinity between microglial processes and axons, and the expression of neuromodulator receptors by microglia.

The ability of microglia to respond to a subset of neuromodulators, neurotransmitters and neuropeptides has been examined in a systematic study on microglia in culture or freshly purified from whole brain [8]. Using intracellular calcium (Ca^{2+}) rise as a readout, this study showed that for each factor tested, including 5-HT, dopamine, nicotine and histamine, a fraction (less than 20%) of microglial cells was responsive, and that these percentages were generally increased by a 24h-pretreatment with lipopolysaccharide (LPS), interferon (IFN)- γ or interleukin (IL)-4 [8,9]. Although the intensity of the elicited Ca^{2+} rise and the percentage of responsive cells are lower than for ATP, considered the “gold standard” for Ca^{2+} response in microglia, this study clearly demonstrated that microglia can respond to each of these neuromodulators. In addition, an absence of Ca^{2+} response can result from a lack of coupling of neuromodulators receptors to Ca^{2+} signaling, or from a receptor expression too low to trigger a detectable signal in these experimental conditions, and thus does not prove a lack of sensitivity. Interestingly, this *ex-vivo* study also indicated that different subpopulations of microglia respond either to one or to subsets of neuromodulators [8]. This functional diversity is consistent with several recent global analyses of microglia at the morphological, electrophysiological, functional or transcriptomic levels, which documented heterogeneity among brain regions [10–12] and during development [13,14]. Thus, the percentage of microglia able to respond to one given ligand may vary drastically depending of place, age and condition.

Practically speaking, a first requirement for being modulated by a secreted factor is to be located close enough to its site of release. Pioneer electron microscopy studies showed ultrastructural evidence of physical contacts between non synaptic varicosities containing norepinephrine or 5-HT and glial processes

[1,6,7]. More recently, we quantified by confocal imaging and 3D reconstruction that at P6 one microglia in the thalamus is surrounded by 43 ± 7 serotonergic varicosities closer than 1 micrometers [15], a distance compatible with volume transmission. We observed similar features in different regions and at several developmental stages. Figure 1 illustrates an example of the proximity of microglia and serotonergic axons in the hippocampus of an adult mouse (Fig. 1A), with even some extremely close contacts identified by 3D reconstruction (Fig. 1B). To our knowledge, similar studies have not been performed for the other neuromodulators, but considering the density of dopaminergic, cholinergic, histaminergic and noradrenergic fibers in sub-regions of the CNS and the mode of transmission of these neuromodulators, it is likely that microglial cells can detect them if they express the appropriate receptors. Probably, the extent of this regulation will vary among brain regions, depending on the density of the fibers of each neuromodulatory system and the amount and affinity of the receptors expressed. Thus, the second requirement for sensing neuromodulators is the expression of adequate receptors. In the next paragraphs and in Table 1, we will summarize what is currently known about this expression in microglia, *in vivo* and in primary cultures of microglia.

Serotonin (5-HT)

In the brain, 5-HT is synthesized by serotonergic neurons of the raphe nuclei located in the brain stem, and released in close and distant regions of the whole CNS. Occasionally, 5-HT can also be released by mast cells lining the outside of brain blood vessels [16].

Fifteen subtypes of 5-HT receptors exist, divided in classes. While the 5-HT₃ receptors are ion channels, all the others are G protein-coupled receptors (GPCRs). By RT- and quantitative PCR it has been shown that 5-HT_{2B} receptor is the main, if not the only, serotonergic receptor expressed in primary microglial cultures [15,17]. Consistently, an agonist of 5-HT_{2B} receptor elicits Ca^{2+} responses in cultured microglia [17]. This receptor is also expressed in microglia freshly isolated from neonatal [15] or adult mouse brain, where other subtypes have also been reported [17].

Dopamine

As other neuromodulatory neurons, dopaminergic neurons are few in number and well clustered in specific brain areas, mainly the substantia nigra and the ventral tegmental area; however, their axons project to many brain regions, including the basal ganglia, the prefrontal cortex, the nucleus accumbens and the amygdala. Moreover, few dopaminergic neurons are located in the arcuate nucleus of the hypothalamus and project to the pituitary gland.

Dopamine receptors are GPCRs pharmacologically classified into 2 major families, activating either $G_{s/olf}$ (D1-like, *i.e.* D1 and D5 receptors) or $G_{i/o}$ proteins (D2-like, *i.e.* D2, D3 and D4 receptors). The first direct evidence of the presence of dopamine receptors (D1, D2, D4, D5R) in rodent microglia dates back to 2005 [18]. Few years later it was demonstrated a similar but not identical (D1 to D4, not D5R) expression pattern in human elderly microglial culture [19]. Nonetheless, the expression pattern of dopamine receptors might be region dependent, as both D1 and D2 receptors were observed in CD11b+ microglia isolated from the nucleus accumbens but not in the hippocampus [20]. It is also likely to be context dependent: according to immunohistochemistry and to a detailed examination of transgenic mice which express EGFP under the control of the *Drd2a* (D2R-encoding gene) promoter, resident microglia do not express D2 receptor in the healthy mouse cortex [21,22]; however, this receptor is found in microglia activated by a cerebral ischemia [22].

Norepinephrine

Norepinephrine is released by the projections of noradrenergic neurons whose soma are located in the locus coeruleus, in the brain stem. Although in rodents their number does not exceed 1500, the complex projections of noradrenergic neurons allow norepinephrine to be released in the whole CNS, with regional variations. There are two classes of receptors for norepinephrine, the alpha (α 1-A, B, C and α 2-A, B, C) and beta (β 1, β 2 and β 3) adrenergic receptors.

In microglial primary culture, there is a consensus on the expression of the $\beta 2$ receptor subtype, based on mRNA expression analysis [23–27] and pharmacological approaches [28–31]. $\beta 2$ adrenergic receptor expression in microglia *in vivo* was confirmed by transcriptome analysis on microglia acutely purified from postnatal whole brain or cortex and hippocampus [14,32]. The expression of $\beta 1$ is more controversial but has been reported in some studies in culture [23,24] and *in vivo* [14,33]. Interestingly, the expression pattern of adrenergic receptors may depend of the physio-pathological state of the brain. Indeed, in microglial primary culture, treatment with LPS decreases the expression of $\beta 2$ and upregulates $\beta 2A$ adrenergic receptor [26,27], which has a higher affinity for norepinephrine.

Acetylcholine (ACh)

ACh, besides being a fast-acting neurotransmitter at the neuromuscular junction, acts as neuromodulator in the CNS [34]. The main source of ACh in the CNS are projection neurons of discrete nuclei (pedunculo pontine tegmental and lateral dorsal tegmental nuclei, medial habenula, etc.), which diffusely innervate the CNS. ACh is also released locally by cholinergic interneurons in the striatum and the nucleus accumbens.

ACh receptors are classified into two main classes: nicotinic receptors (nAChRs), which are ionotropic cation channels permeable to Na^+ and K^+ , and muscarinic GPCRs (mAChRs), divided in five receptor subtypes, M1, M3 and M5 coupled to G_q and M2 and M4 coupled to $G_{i/o}$ proteins. The $\alpha 7$ nAChR, the major component of the cholinergic anti-inflammatory pathway in macrophages [35], is present in murine and rat microglial culture [36–39]. The expression of nAChRs seems to increase upon inflammatory conditions: for instance, in an animal model of Alzheimer's disease, $\alpha 7$ nAChR expression in microglia increases when activated microglia appears at the lesion sites, and decreases in parallel with the increased $\text{A}\beta$ deposition [40,41]. Moreover,

immunohistochemistry demonstrated overexpression of the $\alpha 4\beta 2$ nAChRs in microglia after cerebral ischemia, consistent with *in vivo* increased positron emission tomography signal for a specific ligand [42]. The function of metabotropic ACh receptors on microglia is still largely unexplored. However, using mAChRs agonists, several groups demonstrated a transient increase in intracellular Ca^{2+} in resting microglia [43–45] and a flow cytometry analysis of mouse adult brain identified a subpopulation (around 15%) of M3-positive microglia. Interestingly, the size of the microglia population either responsive to mAChRs agonists or M3-positive increases in pathological conditions such as Alzheimer's disease and stroke [9].

Histamine

In the brain, histamine is released by neurons from the tuberomammillary nucleus of the hypothalamus, or can be degranulated by activated mast cells [46] (a role for this source of Histamine will be illustrated in section 4). Finally, microglia in primary cultures can also express histidine decarboxylase (*Hdc*), the enzyme responsible for histamine production. Its level is low in normal conditions and increases upon LPS treatment [47]. The initial investigation of microglia response to neuromodulators, mentioned above [8], indicate that only 5 to 10% of cultured or freshly purified microglia respond to histamine by a Ca^{2+} increase but this percentage reaches 60% in cells treated for 24h with LPS. Four receptors exist for histamine, H1 to H4, all GPCRs. In primary cultures, mRNA expression analysis as well as pharmacological and functional approaches support the expression of *Hrh3* [47], *Hrh1* and *Hrh4* genes [48]. Surprisingly, bulk transcriptome analysis on acutely purified microglia report an expression mainly of *Hrh2* [14,32], especially in cortical microglia [11], and this *in vitro/vivo* discrepancy will need further investigation.

2. Acute modulation of microglia by neuromodulators: effects on morphology, motility and

phagocytic activity

Dynamic interactions of microglia with other cells are based on the motility of their fine processes, as well as their migration and phagocytic activity. We will hereby summarize how these functions can be rapidly, in a timescale of minutes or hours, regulated by neuromodulators (Fig. 2).

Serotonin (5-HT)

We demonstrated that a local application of 5-HT on acute brain slices induces a directional motility of microglial processes, which is mediated by the 5-HT_{2B} receptor [15,49]. This is consistent with previous observation that 5-HT promotes the increase of microglia processes motility in response to a laser lesion in acute brain slices, as well as the chemotactic response of cultured microglia toward ATP [17]. In addition, an inhibitory effect of high concentrations of 5-HT or of 5-HT₂ agonists on phagocytic activity has been reported in primary cultures and acute brain slices [17].

Dopamine

The effect of dopamine on microglia morphology has been investigated in primary cultures: it reduces the number of cellular processes and increases the cell area in basal conditions, but has an opposite effect, reducing microglial spreading possibly through downregulation of ERK1/2, when microglia are activated by LPS [50]. Regarding migration, it is enhanced by dopamine and D1- and D2-receptor agonists in rodent microglial cultures [18] as well as in human elderly microglia cultures [19]. Importantly, these effects need to be confirmed *in vivo*, notably in normal conditions, as D2R doesn't seem to be expressed by microglia in their basal state [21,22].

Norepinephrine

In terms of morphology, when norepinephrine is applied on acute slices or on primary microglia cultivated in a tridimensional matrix, it induces a reduction of microglial arborization within minutes, through β_2

adrenergic receptors [26]. This is opposite to the effect of ATP which is to induce microglial processes outgrowth, and actually, co-application of norepinephrine prevents this effect of ATP. This suggests that, *in vivo*, variations in norepinephrine tone may alter microglia responsiveness to ATP released by damaged tissues [26]. Interestingly, retraction of microglial processes upon norepinephrine application is also seen in microglia stimulated by LPS for 24h, but this effect is then mediated by α 2A adrenergic receptors. As β 2 and α 2A have different coupling (G_s and G_i , respectively, at least in non-microglial cells), and as norepinephrine does not induce Ca^{2+} rise [26], the signaling pathway mediating the retraction of microglial processes is not elucidated yet.

Norepinephrine does not seem to promote nor inhibit migration of microglia when applied alone [18], but modulatory effects on chemotaxis induced by other compounds have been reported, in primary cultures. On one hand, high doses (30 or 100 μ M) of norepinephrine inhibit chemotaxis toward ATP [26] and C5a complement [31]. The latter effect is likely to occur through β 2 adrenergic receptors and activation of adenylate cyclase, PKA and PI3K. On the other hand, low doses of norepinephrine or of β 2 adrenergic agonist potentiate chemotaxis toward tumor necrosis factor (TNF)- α or amyloid (A) β peptide [51]. This discrepancy could come from the different attractants used, the dose of adrenergic agonists, or both. Importantly, *in vivo*, microglia adoptively transplanted in the brain of a mouse model of Alzheimer's disease, which normally migrate toward the amyloid plaques, fail to do so if the terminals from the locus coeruleus neurons have been depleted of norepinephrine upon treatment with a specific toxin [51]. This support a positive role of norepinephrine on microglia migration *in vivo*, at least in this pathological context.

In primary microglial cultures, norepinephrine potentiates the phagocytosis and degradation of A β peptide [25,51]. According to expression [25] and pharmacology [51] data, this is mediated by β 2 adrenergic receptors. Whether this illustrates a global positive effect of norepinephrine on microglia phagocytic activity or is specific for A β is not known yet, but it may provide an explanation for some *in vivo* observations in models of Alzheimer's disease. Indeed, toxin-based depletion in norepinephrine was shown to induce a reduction of the number of microglia around the amyloid plaques and of their content in A β

peptide, and injury of the locus coeruleus, which worsens memory deficits, increases amyloid plaques deposit and glial inflammation, suggesting a defect in A β elimination [51,52].

Acetylcholine (ACh)

To our knowledge, the potential effect of ACh on microglia migration has not been investigated *per se*; however it has been shown that in primary cultures of microglia, agonists of muscarinic ACh receptors such as carbachol induce chemotaxis [9].

Regarding phagocytosis, metabotropic and ionotropic receptors of ACh may have different effects, or their effect might depend on the target to be phagocytosed. Indeed, carbachol (mAChR agonist) diminishes the phagocytosis of latex beads by primary microglia culture [9], an effect significantly reversed by treatment with IFN- γ . On the contrary, treatment of rat microglia with galantamine, an allosteric activator of $\alpha 7$ nAChR, significantly enhances the phagocytosis of A β in presence of an orthosteric ligand of $\alpha 7$ nAChRs [41]. This latter effect involves Ca²⁺-dependent intracellular signaling cascades [41]. Thus, muscarinic and nicotinic receptors seem to have opposite effects on phagocytosis and it would be interesting to see if the expression of these receptors is coordinately regulated *in vivo* to promote one effect or the other.

Remarkably, several efforts were made to characterize the ACh- and nicotine-induced regulation of intracellular signaling pathways. Both ACh and nicotine lead to a transient increase in intracellular Ca²⁺ [8,38], but surprisingly - considering the ionotropic nature of nAChR -, nicotine-induced intracellular Ca²⁺ increase is independent of extracellular Ca²⁺, and blocked by inhibitors of phospholipase C or inositol phosphate 3 receptor. This supports the hypothesis that $\alpha 7$ nAChRs in microglia do not function as conventional ion channels, but rather drive a signaling cascade which triggers Ca²⁺ release from intracellular stores [38].

Histamine

Histamine alone triggers motility of microglia out of cortical explants, in a H4R-dependent fashion [53], but it inhibits ATP-induced chemotaxis through H3R, in primary cultures [47].

Data on the acute effect of histamine on microglia morphology in the CNS are, to our knowledge, lacking, but mice devoid of *Hdc* enzyme, and thus of histamine, have a reduced microglial coverage. Moreover, intracerebroventricular infusions of histamine or of an H4R agonist for seven days increase total microglial surface in the parenchyma [54]. This would be consistent with a positive role of histamine on microglial processes extension; however, as it is a long-term effect and as histamine receptors are expressed by many cells other than microglia [46], this effect could also be indirect.

Regarding phagocytosis, treating primary microglia in culture with histamine or a H3R agonist for one hour inhibits further phagocytosis of artificial microspheres [47]. In contrast, a pretreatment with histamine at a higher dose and during six hours enhances Fc receptor- and phosphatidyl serine receptor-mediated phagocytosis, through a H1R-dependent mechanism [55]. This discrepancy may be linked to the different kinds of phagocytosis investigated, or reflect difference in short-term and mid-term effects of histamine. Indeed, as it will be discussed in the section 3, a six-hours treatment is likely to induce changes in microglia functional polarization, and thus in the surface receptors and the phagocytic machinery. Following this hypothesis, histamine could be acutely inhibitory for phagocytosis, but progressively inducing a transition of microglia toward a more phagocytic phenotype.

3. Involvement of neuromodulators in the regulation of microglia immune polarization

Microglia can make physical and dynamic interactions with neurons, synapses and amyloid plaques thanks to their motility and phagocytic activity as discussed above. They can also have paracrine actions through the release of soluble factors, either pro- or anti-inflammatory, neurotoxic or neuroprotective - the final effect depending in part on the concentration of the factors, their combination, and the targeted cells. Strikingly, microglia can secrete a vast array of factors, and express a large variety of receptors, depending of their “activation state”, and this is fundamental for their role as central players in CNS disorders [56–58]. Given the common filiation of microglia and macrophages to the myeloid lineage, efforts have even been made to classify microglial activation into a dual scheme, with a classic proinflammatory M1 profile, as opposed to an anti-inflammatory M2 profile, each being characterized by specific markers. Recently, this

dogma has been broken down by cutting edge techniques that showed that microglia show a continuum of activation states (reviewed in [59]). The transitions can be triggered by exogenous bacterial or viral compounds, or by endogenous factors like cytokines, aggregated proteins, etc. In this section and Figure 2, we will show that neuromodulators also can endorse a role of “immune” modulators and regulate the polarization of microglia toward different activation states.

Serotonin (5-HT)

A role of 5-HT in microglia functional polarization is indirectly supported by the observation that lack of 5-HT_{2B} receptor induces the overexpression of several cytokine or cytokine receptors in microglia primary cultures [15], and an abnormal microglial phenotype in a model of amyotrophic lateral sclerosis [60]. This would be consistent with a tonic role of 5-HT in preventing microglia activation, an effect demonstrated for human peripheral macrophages [61], but needing confirmation in microglia. Serotonin might also regulate the dialog between microglia and other by stimulating the release of exosomes from microglia primary cultures [62].

Dopamine

In microglial cultures, dopamine generally exerts a protective effect against LPS-induced inflammation, attenuating notably the release of a prominent indicator of microglial activation, nitric oxide [18]. A signaling pathway that might be involved in the anti-inflammatory actions of dopamine is inhibition of the pro-inflammatory Angiotensin-1 (AT1)/NADPH-oxidase/superoxide axis, observed in microglia upon treatment with both D1 and D2 receptor agonists [63].

Norepinephrine

In rodents, experimentally-induced loss of norepinephrine-secreting neurons and toxin-based depletion of norepinephrine potentiate brain inflammation in response to systemic inflammation [64] and in models of

Parkinson's [65] and Alzheimer's diseases [52]. In Parkinson's and Alzheimer's patients, neuronal loss in the locus coeruleus, where the norepinephrine-secreting neurons are, precedes the neurodegeneration in the substantia nigra and the hippocampus, respectively [66,67]. Altogether, this indicates an anti-inflammatory and neuroprotective role of norepinephrine *in vivo*, and experiments on microglia in primary cultures support the hypothesis that their modulation by norepinephrine is involved in these effects. Indeed, when microglia are treated with LPS to mimic an inflammatory context, they normally release neurotoxic factors. However, co-treatment of microglia with norepinephrine limits their LPS-induced toxicity toward cortical [68] and dopaminergic neurons [29,30]. In addition, the inhibitory effect of norepinephrine and β -adrenergic agonists on LPS-induced expression or release of Tumor Necrosis Factor (TNF)- α , IL-1 β , IL-6, IL-12p40, nitric oxide and reactive oxygen species by microglia is well documented [18,24,27,29,30,65,68]. A comparable inhibitory effect of norepinephrine on the activation of microglia by A β peptide has also been reported [51]. Importantly, *in vivo*, the neuroprotective and anti-inflammatory effect of norepinephrine may also be exerted through non-microglial noradrenergic-sensitive cells, like astrocytes [68].

The signaling pathway linking norepinephrine to inhibition of microglia activation is still a matter of debate. Pharmacological approaches generally point to a role of β 2 adrenergic receptors, which canonical coupling is G_s . However, several studies deny cAMP- and/or PKA-dependent [27,29,30,69], as well as Ca^{2+} -mediated pathways [26], and even the role of classical adrenergic receptor [30]. Non-G protein coupling would be in accordance with the observation that β 2 and α 2A adrenergic receptors have the same morphological effect on microglia [26], although they are supposed to have opposite effects on adenylate cyclase. An alternative pathway could be mediated by β arrestin-2 [29], but this will have to be examined for each effect of norepinephrine.

Acetylcholine (ACh)

In the periphery, inflammation is tightly controlled by the "cholinergic anti-inflammatory pathway" through nAChRs expressed by peripheral immune cells [70]. Recently, the importance of nAChRs, and in particular of α 7 nAChR, in modulating the immune response of microglia to inflammatory stimuli has been broadly

investigated. ACh and nicotine treatment in microglial cultures incubated with LPS drastically reduces MAPK activation and the expression of pro-inflammatory cytokines and factors, such as TNF- α [36,38]. Recently, also LPS-induced proton currents, required for NADPH oxidase-dependent generation of reactive oxygen species [71], were shown to be inhibited by nicotine through the $\alpha 7$ nAChRs [72]. Another possible explanation for the anti-inflammatory action of nAChRs was proposed by Ke et al., who demonstrated that stimulation of nAChR enhances microglial autophagy, a self-protecting cellular pathway, and significantly decreases the production of IL-1 β and IL-18 in the spinal cord from mice with an experimental autoimmune encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis [73]. Conversely, pharmacological blockade of autophagy in the same conditions attenuated the inhibitory effect of $\alpha 7$ nAChR agonists on IL-6, IL-1 β , IL-18, and TNF- α mRNA [74]. Importantly, these experiments have been performed *in vivo*, without targeting specific cell types, thus the role of the *microglial* nAChR in these effects will have to be confirmed. Cortes et al. used a double-hit model of developmental programming of neuroinflammation in sheep fetal brain microglia to elucidate the inflammatory functions of $\alpha 7$ nAChRs: a first hit was given to the pregnant females that were peripherally injected with LPS, and a second hit was given *in vitro*, re-exposing progeny's microglial cells to LPS in presence of selective agonist or antagonist of $\alpha 7$ nAChRs [75]. In line with our discussion, while $\alpha 7$ nAChR agonists reverse the pro-inflammatory microglial phenotype, antagonizing $\alpha 7$ nAChRs does the opposite. ACh was also shown to increase the production of anti-inflammatory factors [37,76–78], and this anti-inflammatory effect of ACh is due to the activation of JAK2-STAT3 and PI3K-Akt pathways and the increased levels of miR-124 and downstream targets C/EBP α (CCAAT/Enhancer Binding Protein α) and PU.1 transcription factors [76]. Among the multitude of articles that clearly demonstrated the anti-inflammatory potential of nAChRs activation, Thomsen and colleagues reported the opposite effects in rat microglia, where a $\alpha 7$ nAChR antagonist and a weak agonist reduced LPS-induced TNF- α release, independent of changes in MAPK signaling [79].

Finally, $\alpha 7$ nAChR stimulation was shown to be neuroprotective, as pre-treatment with nicotine rescues the toxic effect of LPS-activated microglia in neurons cultured from hippocampus and cortex [72]. Beside its immunomodulatory action, stimulation of $\alpha 7$ nAChR might be neuroprotective by increasing the expression

of the glutamate transporter GLAST in microglia, involved in glutamate clearance and therefore important to maintain its extracellular concentrations below excitotoxic levels [39].

Histamine

In vivo, several studies report a protective role of antagonists of histamine receptors in various pathologies, such as Alzheimer's and Parkinson's disease, multiple sclerosis, which parallels a reduction of neuroinflammation in the brain (reviewed in [80]). In contrast to these data supporting a role of histamine in enhancing microglial reactivity, *Hdc* knock-out mice, which do not produce histamine, display an enhanced neuroinflammation following LPS injection [54]. As histamine receptors are expressed in the peripheral immune system and in various cell types in the brain, studies on mutants conditionally invalidated for histamine receptors only in microglia or based on a microglia-targeted delivery of compounds, would be necessary to discriminate between indirect and indirect effects. In their absence, studies on pure microglial cultures showed that a high dose of histamine induces nitrite oxide production and renders the microglial supernatant toxic to dopaminergic neurons [80], an effect which may be relevant in a pathological context. In contrast with this neurotoxic effect, histamine can promote the release of prostaglandin (PG)E₂ by microglia [48], which is synaptogenic on neurons of the preoptic area but not hippocampus [81]. This regulation is involved in the masculinization of the brain as it will be discussed in section 4.

4. Microglia, in vivo effectors of the neuromodulators

Many events can affect the extracellular content of neuromodulators in the CNS and thus trigger changes in microglia. In normal conditions, this content will vary regionally during development, accordingly to the maturation of the neuromodulatory systems. For 5-HT, moreover, transient and ectopic expression of 5-HT transporter (SERT) in non-serotonergic neurons may impact locally on 5-HT availability [82]. On a different time-scale, the level of histamine, 5-HT and norepinephrine undergoes circadian variations, with lower levels during sleep than wake phases. External cues or pathologies superimpose their effects onto these

physiological variations. To give a few examples, peripheral inflammation increases the level of 5-HT and dopamine in the brain for several hours [83] and triggers the release of ACh by the vagus nerve; acute or chronic stress induces an increase in norepinephrine level; chronic antidepressant treatments with selective serotonin or norepinephrine reuptake inhibitors (SSRI, SNRI) or monoamine oxidase inhibitors durably increase the level of 5-HT and/or norepinephrine and other monoamines. Based on the evidences presented in the previous sections, these variations can induce transient or long-lasting changes in microglia and an open question is whether these microglial changes are required to mediate some of the neuronal and behavioral effects induced by these variations.

As most experimental evidence presented in this review were collected *in vitro* or *ex vivo*, we hereby discuss few recent works which support the hypothesis that regulation of microglia by neuromodulators is a relevant process to proper CNS development and to the control of higher brain functions in physiological or pathological conditions.

Serotonin, microglia, and axonal segregation in the visual system

As development proceeds, functional neuronal circuits mature in a dynamic and activity-dependent process requiring axonal refinement [84]. For example, axonal refinement in the visual system follows a precise program: after birth, the retinal ganglion cell axons from both eyes are intermingled in the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN); then, within two weeks after birth, the eye-specific segregation of ipsilateral and contralateral projections, necessary for binocular vision, is set up [85]. The role of microglia in pruning of axons and synapses during this maturation process has been described in depth in the last decade [86,87], but the role of 5-HT in this process is also well documented [82]. A few years ago, our team proposed that this developmental role of 5-HT may implicate microglia [15]. Using mice invalidated for the 5-HT_{2B} receptor gene, the main microglial receptor for 5-HT, we showed that absence of 5-HT_{2B} receptor *in vivo* impairs postnatal axonal refinement in the dLGN. However, as serotonergic neurons also express 5-HT_{2B} receptors, this effect may not be exclusively attributed to microglial dysfunctions and further studies are needed to evaluate the impact of invalidation of the 5-HT_{2B} receptor specifically on microglia.

Histamine, microglia, and the masculinization of the brain

Sexual dimorphism exists in the brain as in other organs and results from developmental programs regulated by sexual hormones. In adult rodents, one difference between male and female brains is a larger number of dendritic spines in the preoptic area of males, a parameter correlated with male copulatory behavior. It results from an increased synaptogenesis during development, induced locally by estradiol and mediated by PGE2 [81,88]. It was known that microglial cells could release PGE2 and were necessary for this form of masculinization of the brain, but recently, an upstream regulation by histamine and mast cells was shown to be part of the mechanism. Indeed, in an elegant study, Lenz et al demonstrated that estradiol induces the degranulation of histamine by mast cells, which in turn potentiates through H1R and H4R the microglial release of PGE2, a factor which promotes dendritic spines formation [48].

Norepinephrine, microglia, and the neuroprotective effect of an enriched environment

It is well documented that raising rodents in an enriched environment, a paradigm of cognitive reserve in humans, promotes their resistance to neuronal and cognitive deficits in several models of Alzheimer's disease. Enriched environment housing also limits the microglial activation which is normally induced by injection of human pathogenic A β oligomers [89]. β 2 adrenergic receptor was known to be required for some of the neuroprotective effects of enriched environment [90] and recently, a study unraveled its role in preventing microglial activation as well, in the model of human A β oligomers injection. Indeed, in this model, the anti-inflammatory effect of enriched environment is suppressed by treatment with β -adrenergic antagonists and is absent in knock-outs of β 1/ β 2 adrenergic receptors. Conversely, it can be mimicked by administration of β -adrenergic agonists [69]. In addition, the authors show that administration of A β oligomers decreases the expression of β -adrenergic receptors in microglia as well as the extracellular content in norepinephrine, and that both alterations are absent in mice raised in an enriched environment. In summary, these data are consistent with a model where activation of microglial β 2 adrenergic receptors is central to prevent Alzheimer's disease progression. In this model, the beneficial effect of enriched

environment would be to increase or sustain the activation of microglial β_2 adrenergic receptors, which tends to be decreased in the presence of A β oligomers. Although an analysis of mice invalidated for β_2 adrenergic receptors in microglia only would be required to validate this model, these data support the idea that regulation of microglia by norepinephrine is relevant for the maintenance of brain homeostasis.

Conclusion and perspectives

Here, we summarized the evidence that microglial cells are equipped to respond to neuromodulators and illustrated how neuromodulators can impact rapidly on microglia processes motility, phagocytosis, and more durably on their immune polarization. These regulations of microglial cells can in turn impact on synapse formation or turnover, neuronal survival, etc. Altogether, these experiments thus support the hypothesis that some of the effects of the neuromodulators on CNS development and homeostasis maintenance may be performed through the modulation of microglia. There are now indications that it could be the case for some developmental functions, like masculinization of the brain and axonal refinement, and for the neuroprotective effect of enriched environment, but many other roles of neuromodulators, for example on mood or response to inflammation, remain to be addressed.

To note is that many of the regulations have been demonstrated on cultivated or freshly purified microglia, and need to be confirmed *in vivo*, by inhibiting or activating receptors selectively in microglia. To do this, crossing transgenic mouse lines is to date the most straightforward but time-consuming approach. Hopefully, the development of better experimental systems, such as microglial targeting with dendrimers and iPSc-derived microglia that can be more easily genetically engineered, will allow in the near future to further explore this exciting research area.

ACKNOWLEDGMENTS:

We warmly thank Dr Catherine Béchade and Dr Luc Maroteaux for their corrections and comments.

We thank the Cell and Tissue Imaging Facility of the Institut du Fer à Moulin, where the images presented in Figure 1 have been acquired and analyzed, and particularly Dr Irinopoulou for the 3D reconstruction on Imaris software.

FUNDINGS :

This work has been supported in part by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Sorbonne Université Sciences, and by grants from Sorbonne Université-Pierre et Marie Curie University [Emergence-UPMC program 2011/2014], the Fondation pour la Recherche sur le Cerveau, the Fondation de France, the Fondation pour la Recherche Médicale [Equipe FRM DEQ2014039529] and the French Ministry of Research [Agence Nationale pour la Recherche ANR-17-CE16-0008 and Investissements d'Avenir programme "Bio-Psy Labex" ANR-11-IDEX-0004-02]. The authors are affiliated to a research group which is member of the Paris School of Neuroscience (ENP) and of the Bio-Psy Labex. A.R. is an Assistant Professor at Sorbonne Université, Paris, France. F.E. is a Ph.D. student affiliated with Sorbonne Université, Collège Doctoral, and is funded by the Bio-Psy Labex [ANR-11-IDEX-0004-02]. G.A. is a post-doctoral fellow funded by the Agence Nationale pour la Recherche [ANR-17-CE16-0008].

CONTRIBUTIONS:

All the authors outlined the subject and revised the manuscript. In addition, G.A. wrote the introduction and the conclusion, the paragraphs on dopamine and ACh, and prepared the figure 2 and the table; FE wrote the paragraphs on 5-HT; AR wrote the introduction and the conclusion, the paragraphs on norepinephrine and histamine, prepared the figure 1 and the table, and supervised the whole process.

CONFLICTS OF INTEREST:

None.

Table 1: Expression of receptors for neuromodulators in microglia.

Biological material: C: primary Culture of microglia, FP: Freshly Purified microglia, S: brain Slices, IV: In Vivo.

When not specified, experiments have been performed on rodents.

Receptor subtypes	Evidence for the expression of the receptors in microglia	References, biological material
Histamine		
?	Histamine application induces a calcium increase in 5-10% of freshly purified or cultured microglia (60% if cells were pretreated with LPS for 24h)	[8] [C, FP]
H1	The effect of histamine on phagocytosis is blocked by H1R antagonists	[55] [C]
H1, H4	Antagonists for H1R and H4R limit the effects of mast cells supernatant on the production of PGE2 by microglia	[48] [C]
H2	RNA-Seq	[11,14,32] [FP]
H3	H3R agonist has similar effects than histamine on phagocytosis, chemotaxis by ATP and response to LPS	[47] [C]
Norepinephrine		
β	The effect of norepinephrine on LPS-induced secretion of PGE2 is blocked by β - not α -adrenergic receptors antagonists	[91] [C]
β	β adrenergic receptors antagonists have the same effect than norepinephrine on cytokine release, phagocytosis, migration, in response to amyloid peptide	[51] [C]
β	An agonist of β adrenergic receptors has the same inhibitory effect than norepinephrine on migration induced by C5a	[31] [C]
α 1 and 2, β 1 and 2	RT-PCR	[24] [C]
α , β 1 and 2	The anti-inflammatory effect of norepinephrine on LPS-treated microglia is blocked by β 1 and β 2 adrenergic receptors antagonists; membrane currents are modulated by norepinephrine and by α - and β -adrenergic agonists	[18] [C]
β 1 and 2	RT-PCR; norepinephrine and agonists of β 1 or β 2 induce cAMP, and antagonists of β 1 or β 2 block the induction of cAMP by norepinephrine	[23] [C]
β 1 and 2	RNA-Seq (found in microglia purified from adult, but not	[14] [FP]

	newborn, animals)	
β1 and 2	A β-adrenergic agonist prevents the induction of cytokines by amyloid peptide; <i>Adrb1</i> and <i>Adrb2</i> genes are detected by QPCR and β2 is detected by Western-Blot.	[69] [C, FP]
β2	A β2 adrenergic agonist inhibits LPS-induced cytokines release	[92] [C]
β2	QPCR	[25] [C]
β2	Some anti-inflammatory effects of norepinephrine are blocked by antagonists of β2 adrenergic receptors	[28] [C]
β2 (high), β1 and α2A (low)	RNA-Seq	[32] [FP]
β2 (and low β1) in basal conditions; α2A (and low β2) after LPS	QPCR; norepinephrine and agonists of β1 and β2 have the same inhibitory effect on the LPS-induced release of inflammatory factors.	[27] [C]
Serotonin (5-HT)		
?	Serotonin application induces a calcium increase in 5-20% of freshly purified or cultured microglia.	[8] [C, FP]
5-HT2, 5A, 7, 1A, 1F, depending on age and preparation	QPCR; membrane currents are modulated by 5-HT and 5-HT2 agonist DOI.	[17] [C, FP]
5-HT2B	RT-PCR; oriented growth of microglial processes toward 5-HT, abolished in 5-HT2B KO mice or in presence of a 5-HT2B-specific antagonist.	[15] [C, FP, S]
Dopamine		
?	Dopamine induces an increase in intracellular Ca ²⁺ in 5-15% of microglia in primary cultures or freshly purified from adult brain.	[8] [C, FP]
?	Dopamine induces morphological remodeling in primary cultures of microglia.	[50] [C]
D1- and D2-like receptors	Membrane currents are modulated by dopamine and D1- and D2-like agonists, dopamine increases motility and inhibits NO production.	[18] [C, S]
D1 to D4	RT-PCR and Immunofluorescence in human elderly cultures of microglia. Dopamine induces chemoattraction on these microglia, which is partly prevented by a D2-like antagonist.	[19] [C, human]
D1, D2	mRNA for D1 and D2R are detected by QPCR in microglia from the Nucleus Accumbens. In addition, 7-8% of microglia (CD11b - positive cells) are found D1R-positive by flow cytometry, in this	[20] [FP]

	brain region.	
D1, D2	Dopamine induces the expression of angiotensin-1 and 2, and this is prevented by D2R antagonists. Agonists of D1 or D2R prevent the induction of angiotensin-1 and 2 and the increase in NADPH oxidase activity upon LPS treatment.	[63] [C]
D2	D2R is detected by immunofluorescence and western-blot in primary cultures of microglia. <i>In vivo</i> , three days after an experimentally induced ischemia, D2R is detected in microglia in ischemic areas, likely due to neo-expression and not to phagocytosis of D2R-containing element. NB: no detection in normal conditions , consistently with [21].	[22] [C, IV after ischemia]
Acetylcholine (ACh)		
nAChR	Nicotine induces an increase in intracellular Ca ²⁺ in 5-15% of freshly purified or cultured microglia.	[8] [C, FP]
$\alpha 7$	RT-PCR; Acetylcholine and nicotine inhibit the release of TNF- α by LPS-treated microglia and this effect is inhibited by antagonists of $\alpha 7$ nAChR.	[36] [C]
$\alpha 7$	RT-PCR	[37] [C]
$\alpha 7$	RT-PCR, Western-Blot; nicotine inhibits the induction of signaling pathways and TNF- α release by LPS, and this effect of nicotine is blocked by a specific antagonist of $\alpha 7$ nAChR.	[38] [C]
$\alpha 7$	RT-PCR, Western-Blot, Immunofluorescence (in cultures, and post-mortem in the brain of an Alzheimer's disease patient); nicotine increases phagocytosis of Amyloid β peptides, this is prevented by a specific antagonist of $\alpha 7$ nAChR.	[41] [C, IV human]
$\alpha 7$	RT-PCR and Western-Blot; nicotine induces GLAST expression in cultured microglia and this is prevented by a specific antagonist of $\alpha 7$ nAChR.	[39] [C]
$\alpha 7$	By immunohistochemistry, in a model of Alzheimer's disease, anti- $\alpha 7$ labeling increases and decreases in parallel with microglial activation	[40] [IV]
$\alpha 7$	Several effects of LPS are inhibited by nicotine and this inhibitory effect is blocked in presence of a specific antagonist of $\alpha 7$ nAChR.	[72] [C]
$\alpha 7$	An agonist and an antagonist of $\alpha 7$ nAChR have opposite effects on the inflammatory profile induced by LPS in microglial cultures.	[75] [C]
$\alpha 4\beta 2$	Seven days after ischemia, increased signal with a $\alpha 4\beta 2$ ligand in positron emission tomography; colocalization of anti-CD11b and anti- $\alpha 4\beta 2$ labelings demonstrated by immunohistochemistry,	[42] [IV]

mAChR?	Carbachol, a mAChR agonist, induces an increase of intracellular Ca ²⁺ in rat or human cultured microglia	[45] [C]; [43] [C, human]
mAChR?	Atropine, a mAChR antagonist, reduces the toxicity of MK-801 on cultured microglia	[44] [C]
M3	A fraction of freshly isolated microglia (11% in basal conditions, 25-60% in models of Alzheimer's disease or stroke) respond to the muscarinic receptors' agonist carbachol by a Ca ²⁺ increase. In a flow cytometry analysis, 16% of microglia are M3R-positive. In culture, carbachol is chemoattractant and inhibits phagocytosis	[9] [FP, C]

LEGENDS:

Figure 1: Close contacts between microglial processes and serotonergic varicosities in the adult brain. (A)

Projection of a 20 μm -thick stack of confocal images from the hippocampus of an adult mouse, illustrating proximity of microglia (red, stained with anti-Iba1 antibody) and serotonergic axons (green, stained with anti-serotonin antibody; note the typical varicosities along the axons). Noteworthy, to estimate distances and visualize appositions, a projection image is not sufficient, and 3D reconstruction is required. Scale bar: 10 μm . (B) Imaris 3D reconstruction from a stack of confocal images allows to show some close appositions (square) of microglial processes and serotonergic axons, in addition to the general presence of varicosities at a micrometer-range distance of microglia. The discontinuous appearance of the serotonergic axons in the reconstruction is due to the contrast between the strongly stained varicosities, where serotonin-containing vesicles accumulate, and the rest of the axons. Nuclei, stained with Bis-Benzimide, are in blue. Left: overview, right: detail showing a microglia process surrounding a serotonin varicosity (asterisk). Scale bars: 5 μm .

Figure 2. Regulation of microglial functions by neuromodulators.

Microglia can act on neurons and other cell types through physical interactions and by releasing a vast array of soluble factors, and neuromodulators were shown to regulate many of these processes. **1:** Phagocytosis of dying neurons, excessive synapses or unwanted compounds is pivotal during CNS development and to maintain CNS homeostasis. Several neuromodulators can regulate phagocytosis, although the final effect seems to be dependent on the target to be phagocytosed. **(1a)** On one hand, clearance of artificial beads is reduced after application of 5-HT [17], histamine [47], and carbachol, an agonist of mACh receptors [9]; **(1b)** on the other hand, phagocytosis and degradation of A β are increased by norepinephrine acting on β 2 receptors [25,51] and ACh acting on α 7 nAChR [41]. Of note, a significant discrepancy was observed with higher concentrations and longer exposure to histamine, which promotes through H1 receptors the phagocytosis of artificial beads (not illustrated here [55]). **2:** To scan the environment and make physical interactions, microglia have to be highly motile, extending and retracting

their fine processes. **(2a)** In normal conditions, besides potentiating ATP-induced increase in microglia process motility (not illustrated here [17]), local applications of 5-HT on acute brain slices induces a directional extension of microglial processes, an effect dependent on 5-HT_{2B} receptors [15]. Norepinephrine instead promotes a fast retraction of microglial processes through β_2 receptors [26] and prevents ATP-induced motility (not illustrated here [26]). **(2a)** In microglia treated with LPS, norepinephrine also induces a reduction of microglial arborization, this time mediated by α_2A receptors [26]. **3 and 4:** Several experiments demonstrate that neuromodulators actively regulate microglial immune polarization and influence their release of soluble factors. **3:** Some of these factors are neurotrophic and promote synaptogenesis, such as PGE₂, whose release is promoted by histamine [48]. **4:** However, in a number of pathological conditions, microglia can become neurotoxic and release pro-inflammatory cytokines, factors and reactive oxygen species. Most neuromodulators, including dopamine, norepinephrine and ACh, exert a protective action by inhibiting this polarization of microglia toward a toxic phenotype after exposure to inflammatory stimuli (numerous references, cited in section 3). **5:** Finally, “danger” or inflammatory signals promote microglial migration and process outgrowth, which are potentiated by 5-HT [17] and agonists of mAChR [9], and inhibited by histamine [47]. Norepinephrine modulates microglial chemotaxis toward danger signals in a dual way: high doses inhibit process outgrowth toward ATP and C5 complement [26,31], but low doses increase chemotaxis toward A β and TNF- α [51]. 5-HT: serotonin; α_2A : α_2A adrenergic receptors; β_2 : β_2 adrenergic receptors; A β : amyloid β ; ACh: acetylcholine; C5: C5 complement protein; LPS: lipopolysaccharide; mAChR: muscarinic acetylcholine receptors; nAChR: nicotinic acetylcholine receptors; PGE₂: prostaglandin E₂.

REFERENCES:

- [1] D.J. Maxwell, C. Leranth, A.A. Verhofstad, Fine structure of serotonin-containing axons in the marginal zone of the rat spinal cord., *Brain Res.* 266 (1983) 253–259.
- [2] L. Descarries, K.C. Watkins, S. Garcia, O. Bosler, G. Doucet, Dual character, asynaptic and synaptic, of the dopamine innervation in adult rat neostriatum: a quantitative autoradiographic and immunocytochemical analysis., *J. Comp. Neurol.* 375 (1996) 167–186.
- [3] M.A. Bunin, R.M. Wightman, Quantitative evaluation of 5-hydroxytryptamine (serotonin) neuronal release and uptake: an investigation of extrasynaptic transmission., *J. Neurosci.* 18 (1998) 4854–4860.
- [4] A. Beaudet, L. Descarries, The monoamine innervation of rat cerebral cortex: synaptic and nonsynaptic axon terminals., *NSC.* 3 (1978) 851–860.
- [5] L.F. Agnati, M. Zoli, I. Strömberg, K. Fuxe, Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission., *NSC.* 69 (1995) 711–726.
- [6] J.L. Ridet, N. Rajaofetra, J.R. Teilhac, M. Geffard, A. Privat, Evidence for nonsynaptic serotonergic and noradrenergic innervation of the rat dorsal horn and possible involvement of neuron-glia interactions., *NSC.* 52 (1993) 143–157.
- [7] C. Aoki, Beta-adrenergic receptors: astrocytic localization in the adult visual cortex and their relation to catecholamine axon terminals as revealed by electron microscopic immunocytochemistry., *J. Neurosci.* 12 (1992) 781–792.
- [8] M. Pannell, F. Szulzewsky, V. Matyash, S.A. Wolf, H. Kettenmann, The subpopulation of microglia sensitive to neurotransmitters/neurohormones is modulated by stimulation with LPS, interferon- γ , and IL-4, *Glia.* 62 (2014) 667–679.
- [9] M. Pannell, M.A. Meier, F. Szulzewsky, V. Matyash, M. Endres, G. Kronenberg, V. Prinz, S. Waiczies, S.A. Wolf, H. Kettenmann, The subpopulation of microglia expressing functional muscarinic acetylcholine receptors expands in stroke and Alzheimer's disease., *Brain Struct Funct.* 221 (2016) 1157–1172. <https://link-springer-com.gate2.inist.fr/article/10.1007/s00429-014-0962-y>.
- [10] L.M. De Biase, K.E. Schuebel, Z.H. Fusfeld, K. Jair, I.A. Hawes, R. Cimbri, H.-Y. Zhang, Q.-R. Liu, H. Shen, Z.-X. Xi, D. Goldman, A. Bonci, Local Cues Establish and Maintain Region-Specific Phenotypes of Basal Ganglia Microglia, *Neuron.* 95 (2017) 341–356.e6.
- [11] K. Grabert, T. Michoel, M.H. Karavolos, S. Clohisey, J.K. Baillie, M.P. Stevens, T.C. Freeman, K.M. Summers, B.W. McColl, Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging., *Nat. Neurosci.* 19 (2016) 504–516. <http://www.nature.com/articles/nn.4222>.
- [12] P. Ayata, A. Badimon, H.J. Strasburger, M.K. Duff, S.E. Montgomery, Y.-H.E. Loh, A. Ebert, A.A. Pimenova, B.R. Ramirez, A.T. Chan, J.M. Sullivan, I. Purushothaman, J.R. Scarpa, A.M. Goate, M. Busslinger, L. Shen, B. Losic, A. Schaefer, Epigenetic regulation of brain region-specific microglia clearance activity, *Nat. Neurosci.* 21 (2018) 1–25. <http://www.nature.com/articles/s41593-018-0192-3>.

- [13] Q. Li, Z. Cheng, L. Zhou, S. Darmanis, N.F. Neff, J. Okamoto, G. Gulati, M.L. Bennett, L.O. Sun, L.E. Clarke, J. Marschallinger, G. Yu, S.R. Quake, T. Wyss-Coray, B.A. Barres, Developmental Heterogeneity of Microglia and Brain Myeloid Cells Revealed by Deep Single-Cell RNA Sequencing., *Neuron*. 101 (2019) 207–223.e10.
- [14] O. Matcovitch-Natan, D.R. Winter, A. Giladi, S. Vargas Aguilar, A. Spinrad, S. Sarrazin, H. Ben-Yehuda, E. David, F. Zelada González, P. Perrin, H. Keren-Shaul, M. Gury, D. Lara-Astaiso, C.A. Thaïss, M. Cohen, K. Bahar Halpern, K. Baruch, A. Deczkowska, E. Lorenzo-Vivas, S. Itzkovitz, E. Elinav, M.H. Sieweke, M. Schwartz, I. Amit, Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis., *Science* (80-.). 353 (2016) aad8670–aad8670.
<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.aad8670>.
- [15] M. Kolodziejczak, C. Béchade, N. Gervasi, T. Irinopoulou, S.M. Banas, C. Cordier, A. Rebsam, A. Roumier, L. Maroteaux, Serotonin Modulates Developmental Microglia via 5-HT 2B Receptors: Potential Implication during Synaptic Refinement of Retinogeniculate Projections, *ACS Chem. Neurosci.* 6 (2015) 1219–1230. doi:10.1021/cn5003489.
- [16] R. Silver, J.P. Curley, Mast cells on the mind: new insights and opportunities, *Trends Neurosci.* 36 (2013) 513–521.
- [17] G. Krabbe, V. Matyash, U. Pannasch, L. Mamer, H.W.G.M. Boddeke, H. Kettenmann, Activation of serotonin receptors promotes microglial injury-induced motility but attenuates phagocytic activity., *Brain Behav. Immun.* 26 (2012) 419–428.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889159111006039>.
- [18] K. Färber, U. Pannasch, H. Kettenmann, Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells, *Mol. Cell. Neurosci.* 29 (2005) 128–138.
- [19] D. Mastroeni, A. Grover, B. Leonard, J.N. Joyce, P.D. Coleman, B. Kozik, D.L. Bellinger, J. Rogers, Microglial responses to dopamine in a cell culture model of Parkinson’s disease, *Neurobiol. Aging.* 30 (2009) 1805–1817. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.01.001.
- [20] J.M. Schwarz, S.H. Smith, S.D. Bilbo, FACS analysis of neuronal-glia interactions in the nucleus accumbens following morphine administration., *Psychopharmacology (Berl.)*. 230 (2013) 525–535.
- [21] J. Khlgatyan, C. Quintana, M. Parent, J.-M. Beaulieu, High Sensitivity Mapping of Cortical Dopamine D2 Receptor Expressing Neurons., *Cereb. Cortex.* 22 (2018) 666.
<https://academic.oup.com/cercor/advance-article/doi/10.1093/cercor/bhy261/5122732>.
- [22] J.H.J. Huck, D. Freyer, C. Böttcher, M. Mladinov, C. Muselmann-Genschow, M. Thielke, N. Gladow, D. Bloomquist, P. Mergenthaler, J. Priller, De novo expression of dopamine D2 receptors on microglia after stroke, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 35 (2015) 1804–1811. doi:10.1038/jcbfm.2015.128.
- [23] K.F. Tanaka, H. Kashima, H. Suzuki, K. Ono, M. Sawada, Existence of functional beta1- and beta2-adrenergic receptors on microglia., *J. Neurosci. Res.* 70 (2002) 232–237.
- [24] K. Mori, E. Ozaki, B. Zhang, L. Yang, A. Yokoyama, I. Takeda, N. Maeda, M. Sakanaka, J. Tanaka, Effects of norepinephrine on rat cultured microglial cells that express alpha1, alpha2, beta1 and beta2 adrenergic receptors., *Neuropharmacology.* 43 (2002) 1026–1034.

- [25] Y. Kong, L. Ruan, L. Qian, X. Liu, Y. Le, Norepinephrine Promotes Microglia to Uptake and Degrade Amyloid \sim Peptide through Upregulation of Mouse Formyl Peptide Receptor 2 and Induction of Insulin-Degrading Enzyme, *J. Neurosci.* 30 (2010) 11848–11857.
- [26] S. Gyoneva, S.F. Traynelis, Norepinephrine modulates the motility of resting and activated microglia via different adrenergic receptors., *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 15291–15302.
- [27] Y. Ishii, A. Yamaizumi, A. Kawakami, A. Islam, M.E. Choudhury, H. Takahashi, H. Yano, J. Tanaka, Anti-inflammatory effects of noradrenaline on LPS-treated microglial cells: Suppression of NF κ B nuclear translocation and subsequent STAT1 phosphorylation, *Neurochem. Int.* 90 (2015) 56–66.
- [28] C. Dello Russo, A.I. Boullerne, V. Gavriluk, D.L. Feinstein, Inhibition of microglial inflammatory responses by norepinephrine: effects on nitric oxide and interleukin-1 β production., *J. Neuroinflammation.* 1 (2004) 9.
- [29] L. Qian, H. Wu, S.-H. Chen, D. Zhang, S.F. Ali, L. Peterson, B. Wilson, R.-B. Lu, J.-S. Hong, P.M. Flood, β 2-adrenergic receptor activation prevents rodent dopaminergic neurotoxicity by inhibiting microglia via a novel signaling pathway., *J. Immunol.* 186 (2011) 4443–4454.
- [30] L. Jiang, S.-H. Chen, C.-H. Chu, S.-J. Wang, E. Oyarzabal, B. Wilson, V. Sanders, K. Xie, Q. Wang, J.-S. Hong, A novel role of microglial NADPH oxidase in mediating extra-synaptic function of norepinephrine in regulating brain immune homeostasis, *Glia.* 63 (2015) 1057–1072.
- [31] N. Schneble, C. Schmidt, R. Bauer, J.Ä. rg P. MÄller, S. Monajembashi, R. Wetzker, Phosphoinositide 3-kinase \hat{t} ies chemoattractant- and adrenergic control of microglial motility, *Mol. Cell. Neurosci.* 78 (2017) 1–8.
- [32] Y. Zhang, K. Chen, S.A. Sloan, M.L. Bennett, A.R. Scholze, S. O'Keeffe, H.P. Phatnani, P. Guarnieri, C. Caneda, N. Ruderisch, S. Deng, S.A. Liddelow, C. Zhang, R. Daneman, T. Maniatis, B.A. Barres, J.Q. Wu, An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex, *J. Neurosci.* 34 (2014) 11929–11947. <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014>.
- [33] L. Hertz, D. Lovatt, S.A. Goldman, M. Nedergaard, Adrenoceptors in brain: cellular gene expression and effects on astrocytic metabolism and [Ca(2+)]_i, *Neurochem. Int.* 57 (2010) 411–420.
- [34] M.R. Picciotto, M.J. Higley, Y.S. Mineur, Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior., *Neuron.* 76 (2012) 116–129.
- [35] H. Wang, M. Yu, M. Ochani, C.A. Amella, Wang H_Nature_Nicotinic acetylcholine receptor α 7 subunit is an essential regulator of inflammation, 421 (2003) 1–5.
- [36] R.D. Shytle, T. Mori, K. Townsend, M. Vendrame, N. Sun, J. Zeng, J. Ehrhart, A.A. Silver, P.R. Sanberg, J. Tan, Cholinergic modulation of microglial activation by α 7 nicotinic receptors, *J. Neurochem.* 89 (2004) 337–343. doi:10.1046/j.1471-4159.2004.02347.x.
- [37] R. De Simone, M.A. Ajmone-Cat, D. Carnevale, L. Minghetti, Activation of α 7 nicotinic acetylcholine receptor by nicotine selectively up-regulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in rat microglial cultures., *J. Neuroinflammation.* 2 (2005) 4.

- [38] T. Suzuki, I. Hide, A. Matsubara, C. Hama, K. Harada, K. Miyano, M. Andrä, H. Matsubayashi, N. Sakai, S. Kohsaka, K. Inoue, Y. Nakata, Microglial $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role, *J. Neurosci. Res.* 83 (2006) 1461–1470.
- [39] N. Morioka, M. Tokuhara, Y. Nakamura, Y. Idenoshita, S. Harano, F.F. Zhang, K. Hisaoka-Nakashima, Y. Nakata, Primary cultures of rat cortical microglia treated with nicotine increases in the expression of excitatory amino acid transporter 1 (GLAST) via the activation of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, *Neuroscience.* 258 (2014) 374–384. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.11.044.
- [40] A. Matsumura, S. Suzuki, N. Iwahara, S. Hisahara, J. Kawamata, H. Suzuki, A. Yamauchi, K. Takata, Y. Kitamura, S. Shimohama, Temporal changes of CD68 and $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor expression in microglia in Alzheimer’s disease-like mouse models, *J. Alzheimer’s Dis.* 44 (2015) 409–423. doi:10.3233/JAD-141572.
- [41] K. Takata, Y. Kitamura, M. Saeki, M. Terada, S. Kagitani, R. Kitamura, Y. Fujikawa, A. Maelicke, H. Tomimoto, T. Taniguchi, S. Shimohama, Galantamine-induced amyloid-beta clearance mediated via stimulation of microglial nicotinic acetylcholine receptors., *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 40180–40191.
- [42] A. Martin, B. Szczupak, V. Gomez-Vallejo, M. Domercq, A. Cano, D. Padro, C. Munoz, M. Higuchi, C. Matute, J. Llop, In Vivo PET Imaging of the $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor As a Marker for Brain Inflammation after Cerebral Ischemia, *J. Neurosci.* 35 (2015) 5998–6009. doi:10.1523/JNEUROSCI.3670-14.2015.
- [43] L. Zhang, J.G. McLarnon, V. Goghari, Y.B. Lee, S.U. Kim, C. Krieger, Cholinergic agonists increase intracellular Ca^{2+} in cultured human microglia, *Neurosci. Lett.* 255 (1998) 33–36. doi:10.1016/S0304-3940(98)00706-X.
- [44] M. Hirayama, M. Kuriyama, MK-801 is cytotoxic to microglia in vitro and its cytotoxicity is attenuated by glutamate, other excitotoxic agents and atropine: Possible presence of glutamate receptor and muscarinic receptor on microglia, *Brain Res.* 897 (2001) 204–206. doi:10.1016/S0006-8993(01)02114-X.
- [45] E.R. Whittemore, A.R. Korotzer, A. Etebari, C.W. Cotman, Carbachol increases intracellular free calcium in cultured rat microglia, *Brain Res.* 621 (1993) 59–64. doi:10.1016/0006-8993(93)90297-Z.
- [46] A.H. de Haas, H.W.G.M. Boddeke, K. Biber, Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS, *Glia.* 56 (2008) 888–894.
- [47] T. Iida, T. Yoshikawa, T. Matsuzawa, F. Naganuma, T. Nakamura, Y. Miura, A.S. Mohsen, R. Harada, R. Iwata, K. Yanai, Histamine H₃ receptor in primary mouse microglia inhibits chemotaxis, phagocytosis, and cytokine secretion, *Glia.* 63 (2015) 1213–1225.
- [48] K.M. Lenz, L.A. Pickett, C.L. Wright, K.T. Davis, A. Joshi, M.M. McCarthy, Mast Cells in the Developing Brain Determine Adult Sexual Behavior, *J. Neurosci.* 38 (2018) 8044–8059.
- [49] F. Etienne, V. Mastrolia, L. Maroteaux, J.-A. Girault, N. Gervasi, A. Roumier, Two-photon Imaging of Microglial Processes’ Attraction Toward ATP or Serotonin in Acute Brain Slices, *JoVE.* (2019) 1–26.

- [50] Y. Fan, Z. Chen, J.L. Pathak, A.M.D. Carneiro, C.Y. Chung, Differential Regulation of Adhesion and Phagocytosis of Resting and Activated Microglia by Dopamine, *Front. Cell. Neurosci.* 12 (2018) 1–14. doi:10.3389/fncel.2018.00309.
- [51] M.T. Heneka, F. Nadrigny, T. Regen, A. Martinez-Hernandez, L. Dumitrescu-Ozimek, D. Terwel, D. Jardanhazi-Kurutz, J. Walter, F. Kirchhoff, U.-K. Hanisch, M.P. Kummer, Locus ceruleus controls Alzheimer's disease pathology by modulating microglial functions through norepinephrine., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (2010) 6058–6063.
- [52] M.T. Heneka, M. Ramanathan, A.H. Jacobs, L. Dumitrescu-Ozimek, A. Bilkei-Gorzo, T. Debeir, M. Sastre, N. Galldiks, A. Zimmer, M. Hoehn, W.-D. Heiss, T. Klockgether, M. Staufenbiel, Locus ceruleus degeneration promotes Alzheimer pathogenesis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice., *J. Neurosci.* 26 (2006) 1343–1354.
- [53] R. Ferreira, T. Santos, J. Gonçalves, G. Baltazar, L. Ferreira, F. Agasse, L. Bernardino, Histamine modulates microglia function., *J. Neuroinflammation.* 9 (2012) 90.
- [54] L. Frick, M. Rapanelli, E. Abbasi, H. Ohtsu, C. Pittenger, Histamine regulation of microglia: Gene-environment interaction in the regulation of central nervous system inflammation., *Brain. Behav. Immun.* 57 (2016) 326–337.
- [55] S.M. Rocha, T. Saraiva, A.C. Cristóvão, R. Ferreira, T. Santos, M. Esteves, C. Saraiva, G. Je, L. Cortes, J. Valero, G. Alves, A. Klibanov, Y.-S. Kim, L. Bernardino, Histamine induces microglia activation and dopaminergic neuronal toxicity via H1 receptor activation, *J. Neuroinflammation.* (2016) 1–16.
- [56] A.C. Liberman, E. Trias, L. da Silva Chagas, P. Trindade, M. dos Santos Pereira, D. Refojo, C. Hedin-Pereira, C.A. Serfaty, Neuroimmune and Inflammatory Signals in Complex Disorders of the Central Nervous System, *Neuroimmunomodulation.* (2018) 1–25. doi:10.1159/000494761.
- [57] S. Voet, M. Prinz, G. van Loo, Microglia in central nervous system inflammation and multiple sclerosis pathology, *Trends Mol. Med.* in press (2018) 1–12. doi:10.1016/j.molmed.2018.11.005.
- [58] M.W. Salter, B. Stevens, Microglia emerge as central players in brain disease, *Nat. Med.* 23 (2017) 1018–1027. doi:10.1038/nm.4397.
- [59] R.M. Ransohoff, A polarizing question: Do M1 and M2 microglia exist, *Nat. Neurosci.* 19 (2016) 987–991. doi:10.1038/nn.4338.
- [60] H. El Oussini, H. Bayer, J. Scekcic-Zahirovic, P. Vercruyssen, J. Sinniger, S. Dirrig-Grosch, S. Dieterlé, A. Echaniz-Laguna, Y. Larmet, K. Müller, J.H. Weishaupt, D.R. Thal, W. van Rheenen, K. van Eijk, R. Lawson, L. Monassier, L. Maroteaux, A. Roumier, P.C. Wong, L.H. van den Berg, A.C. Ludolph, J.H. Veldink, A. Witting, L. Dupuis, Serotonin 2B receptor slows disease progression and prevents degeneration of spinal cord mononuclear phagocytes in amyotrophic lateral sclerosis., *Acta Neuropathol.* 131 (2016) 465–480. <http://link.springer.com/10.1007/s00401-016-1534-4>.
- [61] M. de Las Casas-Engel, A. Domínguez-Soto, E. Sierra-Filardi, R. Bragado, C. Nieto, A. Puig-Kroger, R. Samaniego, M. Loza, M.T. Corcuera, F. Gómez-Aguado, M. Bustos, P. Sánchez-Mateos, A.L. Corbí, Serotonin Skews Human Macrophage Polarization through HTR2B and HTR7., *J. Immunol.* 190 (2013) 2301–2310. <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1201133>.

- [62] K. Glebov, M. Löchner, R. Jabs, T. Lau, O. Merkel, P. Schloss, C. Steinhäuser, J. Walter, Serotonin stimulates secretion of exosomes from microglia cells, *Glia*. (2014) n/a–n/a.
- [63] A. Dominguez-Meijide, A.I. Rodriguez-Perez, C. Diaz-Ruiz, M.J. Guerra, J.L. Labandeira-Garcia, Dopamine modulates astroglial and microglial activity via glial renin-angiotensin system in cultures, *Brain. Behav. Immun.* 62 (2017) 277–290. doi:10.1016/j.bbi.2017.02.013.
- [64] K.L. Bharani, R. Derex, A.-C. Granholm, A. Ledreux, A noradrenergic lesion aggravates the effects of systemic inflammation on the hippocampus of aged rats, *PLoS One*. 12 (2017) e0189821–20.
- [65] N. Yao, Y. Wu, Y. Zhou, L. Ju, Y. Liu, R. Ju, D. Duan, Q. Xu, Lesion of the locus coeruleus aggravates dopaminergic neuron degeneration by modulating microglial function in mouse models of Parkinson's disease., *Brain Res.* 1625 (2015) 255–274.
- [66] H. Braak, K. Del Tredici, U. Rüb, R.A.I. de Vos, E.N.H. Jansen Steur, E. Braak, Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease., *Neurobiol. Aging*. 24 (2003) 197–211.
- [67] C. Zarow, S.A. Lyness, J.A. Mortimer, H.C. Chui, Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases., *Arch. Neurol.* 60 (2003) 337–341.
- [68] J.L.M. Madrigal, D.L. Feinstein, C. Dello Russo, Norepinephrine protects cortical neurons against microglial-induced cell death, *J. Neurosci. Res.* 81 (2005) 390–396.
- [69] H. Xu, M.M. Rajsombath, P. Weikop, D.J. Selkoe, Enriched environment enhances β -adrenergic signaling to prevent microglia inflammation by \sim amyloid- β ., *EMBO Mol. Med.* 10 (2018) e8931.
- [70] M. Rosas-Ballina, K.J. Tracey, Cholinergic control of inflammation., *J. Intern. Med.* 265 (2009) 663–679.
- [71] L.-J. Wu, G. Wu, M.R.A. Sharif, A. Baker, Y. Jia, F.H. Fahey, H.R. Luo, E.P. Feener, D.E. Clapham, The voltage-gated proton channel Hv1 enhances brain damage from ischemic stroke, *Nat. Neurosci.* 15 (2012) 565–573. doi:10.1038/nn.3059.
- [72] M. Noda, A. Kobayashi, Nicotine inhibits activation of microglial proton currents via interactions with α 7 acetylcholine receptors, *J. Physiol. Sci.* 67 (2017) 235–245. doi:10.1007/s12576-016-0460-5.
- [73] P. Ke, B.Z. Shao, Z.Q. Xu, X.W. Chen, W. Wei, C. Liu, Activating α 7 nicotinic acetylcholine receptor inhibits NLRP3 inflammasome through regulation of β -arrestin-1, *CNS Neurosci. Ther.* 23 (2017) 875–884. doi:10.1111/cns.12758.
- [74] B.Z. Shao, P. Ke, Z.Q. Xu, W. Wei, M.H. Cheng, B.Z. Han, X.W. Chen, D.F. Su, C. Liu, Autophagy plays an important role in anti-inflammatory mechanisms stimulated by α 7 nicotinic acetylcholine receptor, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1–13. doi:10.3389/fimmu.2017.00553.
- [75] M. Cortes, M. Cao, H.L. Liu, C.S. Moore, L.D. Durosier, P. Burns, G. Fecteau, A. Desrochers, L.B. Barreiro, J.P. Antel, M.G. Frasch, α 7 nicotinic acetylcholine receptor signaling modulates the inflammatory phenotype of fetal brain microglia: First evidence of interference by iron homeostasis, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–15. doi:10.1038/s41598-017-09439-z.
- [76] Q. Zhang, Y. Lu, H. Bian, L. Guo, H. Zhu, Activation of the α 7 nicotinic receptor promotes

- lipopolysaccharide-induced conversion of M1 microglia to M2, *Am. J. Transl. Res.* 9 (2017) 971–985.
- [77] E. Parada, J. Egea, I. Buendia, P. Negredo, A.C. Cunha, S. Cardoso, M.P. Soares, M.G. López, The Microglial $\alpha 7$ -Acetylcholine Nicotinic Receptor Is a Key Element in Promoting Neuroprotection by Inducing Heme Oxygenase-1 *via* Nuclear Factor Erythroid-2-Related Factor 2, *Antioxid. Redox Signal.* 19 (2013) 1135–1148. doi:10.1089/ars.2012.4671.
- [78] R.B. Rock, G. Gekker, R.N. Aravalli, S. Hu, W.S. Sheng, P.K. Peterson, Potentiation of HIV-1 expression in microglial cells by nicotine: Involvement of transforming growth factor- $\beta 1$, *J. Neuroimmune Pharmacol.* 3 (2008) 143–149. doi:10.1007/s11481-007-9098-7.
- [79] M.S. Thomsen, J.D. Mikkelsen, The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ligands methyllycaconitine, NS6740 and GTS-21 reduce lipopolysaccharide-induced TNF- α release from microglia, *J. Neuroimmunol.* 251 (2012) 65–72. doi:10.1016/j.jneuroim.2012.07.006.
- [80] S.M. Rocha, J. Pires, M. Esteves, B. Graça, L. Bernardino, Histamine: a new immunomodulatory player in the neuron-glia crosstalk., *Front. Cell. Neurosci.* 8 (2014) 120.
- [81] S.K. Amateau, M.M. McCarthy, A novel mechanism of dendritic spine plasticity involving estradiol induction of prostaglandin-E₂., *J. Neurosci.* 22 (2002) 8586–8596.
- [82] P. Gaspar, O. Cases, L. Maroteaux, The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics, *Nat Rev Neurosci.* 4 (2003) 1002–1012.
- [83] Y. Guo, H. Cai, L. Chen, D. Liang, R. Yang, R. Dang, P. Jiang, Quantitative profiling of neurotransmitter abnormalities in the hippocampus of rats treated with lipopolysaccharide: Focusing on kynurenine pathway and implications for depression, *J. Neuroimmunol.* 295–296 (2016) 41–46. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165572816300765>.
- [84] S. Cohen-Cory, The Developing Synapse: Construction and Modulation of Synaptic Structures and Circuits, *Science* (80-.). 298 (2002) 770–776. doi:10.1126/science.1075510.
- [85] A.D. Huberman, M. Manu, S.M. Koch, M.W. Susman, A.B. Lutz, E.M. Ullian, S.A. Baccus, B.A. Barres, Architecture and Activity-Mediated Refinement of Axonal Projections from a Mosaic of Genetically Identified Retinal Ganglion Cells, *Neuron.* 59 (2008) 425–438. doi:10.1016/j.neuron.2008.07.018.
- [86] D.P. Schafer, E.K. Lehrman, A.G. Kautzman, R. Koyama, A.R. Mardinly, R. Yamasaki, R.M. Ransohoff, M.E. Greenberg, B.A. Barres, B. Stevens, Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner, *Neuron.* 74 (2012) 691–705. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627312003340>.
- [87] B. Stevens, N.J. Allen, L.E. Vazquez, G.R. Howell, K.S. Christopherson, N. Nouri, K.D. Micheva, A.K. Mehalow, A.D. Huberman, B. Stafford, A. Sher, A.M. Litke, J.D. Lambris, S.J. Smith, S.W.M. John, B.A. Barres, The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination, *Cell.* 131 (2007) 1164–1178.
- [88] S.K. Amateau, M.M. McCarthy, Induction of PGE₂ by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior., *Nat. Neurosci.* 7 (2004) 643–650.
- [89] H. Xu, E. Gelyana, M. Rajsombath, T. Yang, S. Li, D. Selkoe, Environmental Enrichment Potently

Prevents Microglia-Mediated Neuroinflammation by Human Amyloid β -Protein Oligomers., *J. Neurosci.* 36 (2016) 9041–9056.

- [90] S. Li, M. Jin, D. Zhang, T. Yang, T. Koeglsperger, H. Fu, D.J. Selkoe, Environmental novelty activates β 2-adrenergic signaling to prevent the impairment of hippocampal LTP by A β oligomers., *Neuron.* 77 (2013) 929–941.
- [91] J.C.M. Schlachetzki, B.L. Fiebich, E. Haake, A.C.P. de Oliveira, E. Candelario-Jalil, M.T. Heneka, M. Hüll, Norepinephrine enhances the LPS-induced expression of COX-2 and secretion of PGE2 in primary rat microglia., *J. Neuroinflammation.* 7 (2010) 2.
- [92] M. Prinz, K.G. Häusler, H. Kettenmann, U. Hanisch, beta-adrenergic receptor stimulation selectively inhibits IL-12p40 release in microglia., *Brain Res.* 899 (2001) 264–270.
- [93] S. Calovi, P. Mut-Arbona, B. Sperlágh, Microglia and the Purinergic Signaling System., *Neuroscience.* 405 (2019) 137–147.
<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=30582977&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- [94] G.A. Cabral, F. Marciano-Cabral, Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance., *J. Leukoc. Biol.* 78 (2005) 1192–1197.
<http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.0405216>.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

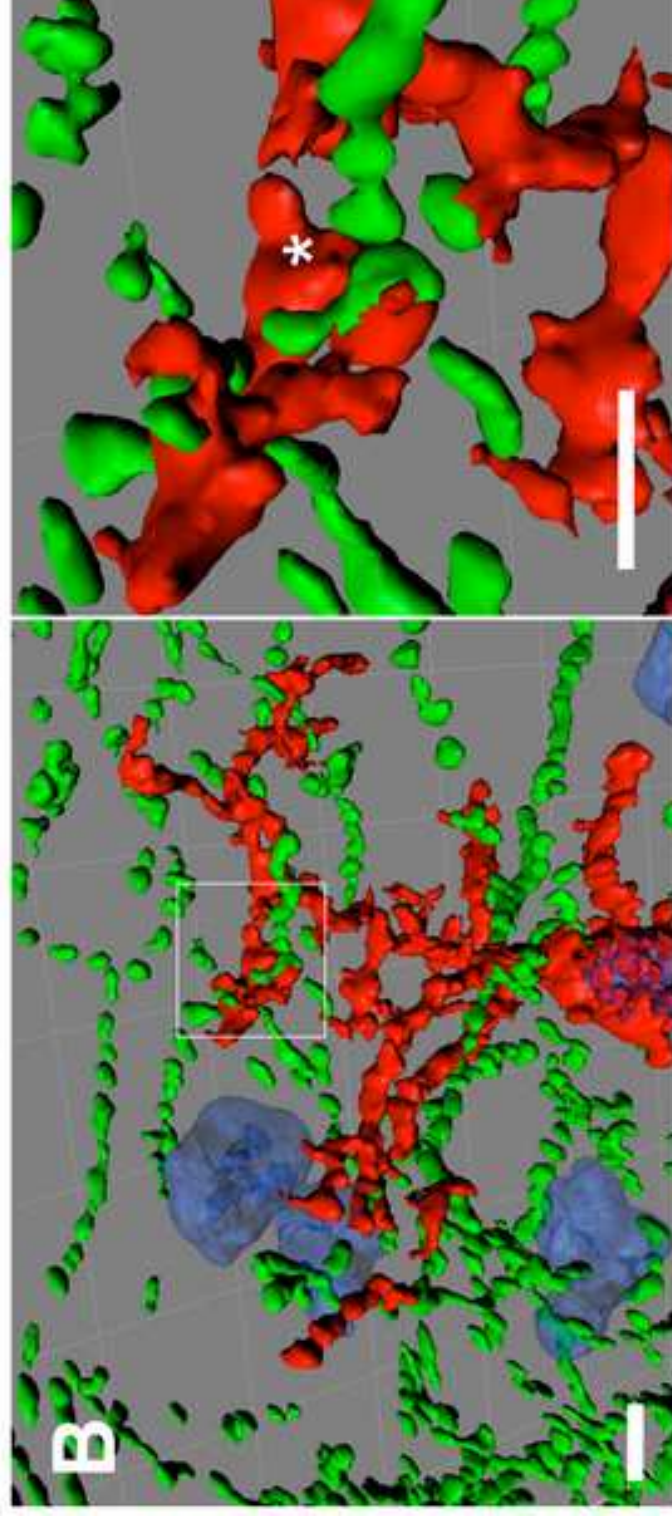
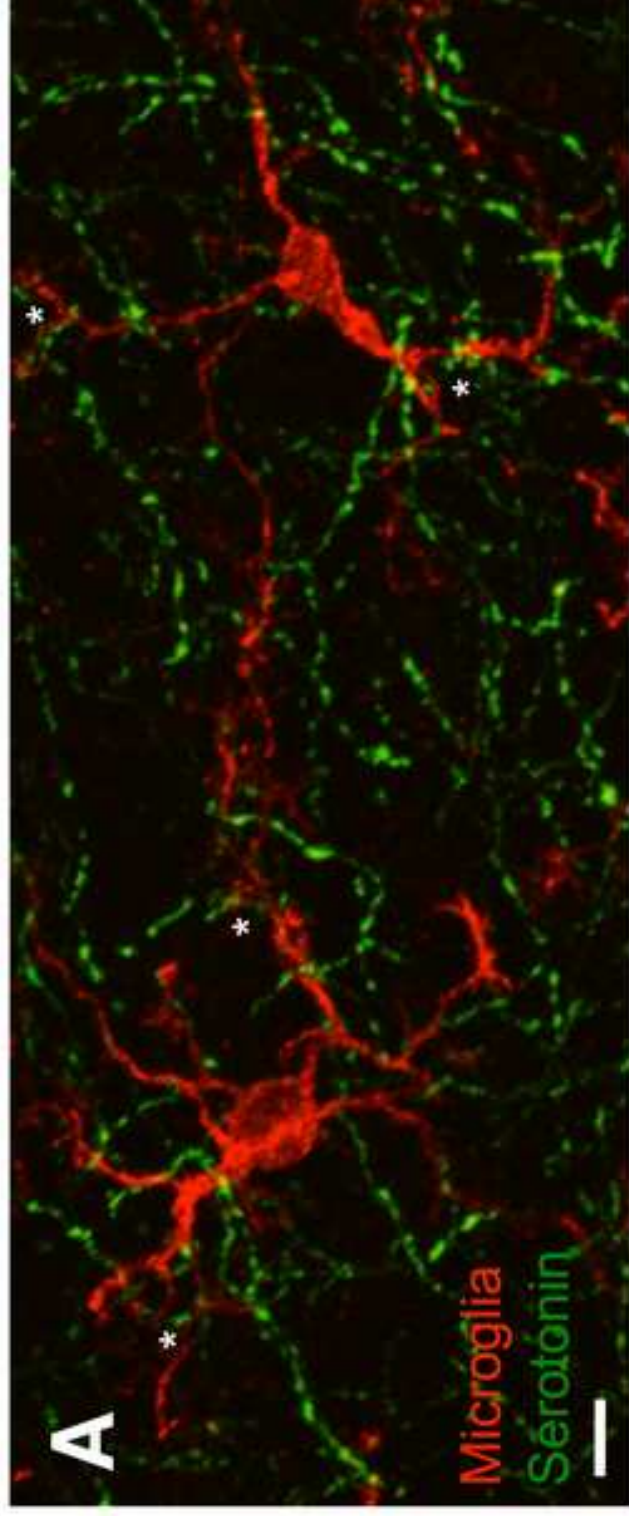
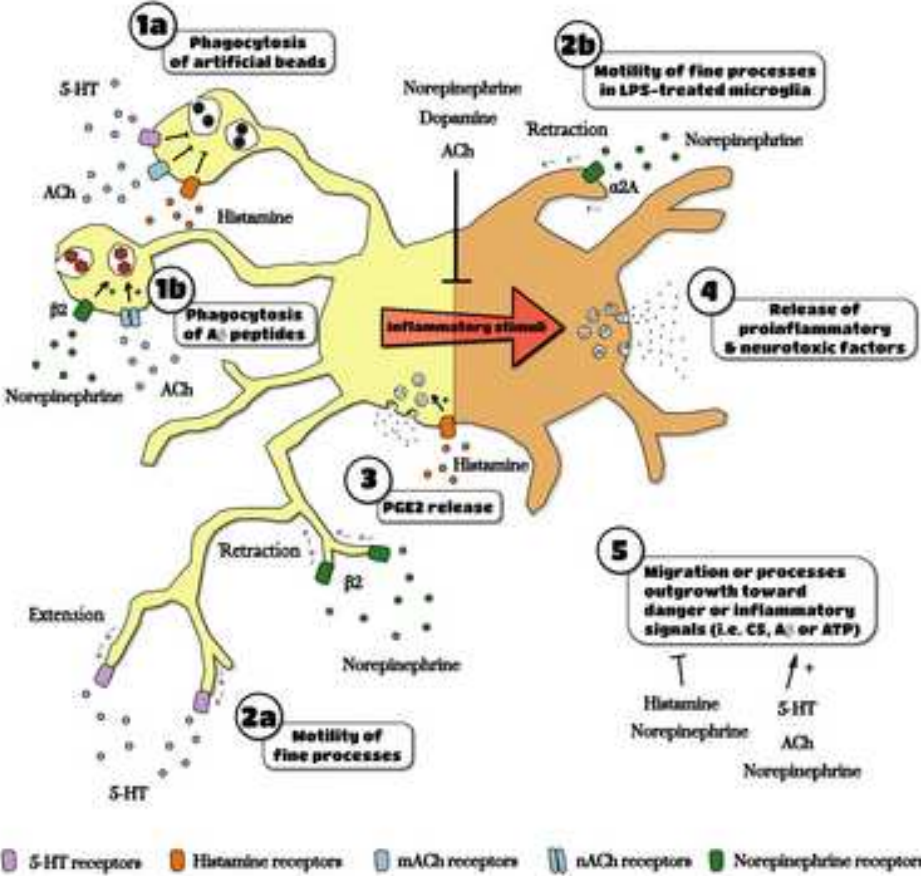


Figure 2 Neurosc Letters
[Click here to download high resolution image](#)



Annexe 2 : Rôle du récepteur 5-HT2B dans la neuroinflammation induite par injection périphérique de LPS

Le récepteur 5-HT2B microglial limite la neuroinflammation et le comportement de maladie à l'âge adulte

Article soumis le 23 Juillet 2018 dans le journal « Biological Psychiatry »

1. Contexte

Chez la souris et l'homme, une inflammation périphérique induit des changements comportementaux que l'on appelle « comportement de maladie » caractérisés par l'anhédonie, une diminution de la locomotion et une diminution du temps consacré à des activités spécifiques telles que le toilettage, l'interaction social et la prise alimentaire. Au niveau moléculaire, une inflammation périphérique a des répercussions sur le système immunitaire périphérique et central induisant la libération de facteurs solubles tels que les cytokines par les cellules de l'immunité. De plus, une inflammation prolongée a des effets néfastes sur l'organisme et peut avoir des répercussions sur l'apparition de symptômes dépressifs à long terme ainsi que de dysfonctionnement cognitif. Dans les macrophages humains, le récepteur 5-HT2B est préférentiellement exprimé par les macrophages M2 et il est nécessaire à la polarisation et au maintien des cellules immunitaires périphériques dans un état anti-inflammatoire. D'autre part, dans un modèle de souris de sclérose latérale amyotrophique, la délétion du récepteur 5-HT2B est associée à une accélération de la progression de la maladie avec une augmentation de la dégénérescence des microglies. Ces données suggèrent un rôle du récepteur 5-HT2B dans le contrôle de l'activation microgliale, notamment dans la terminaison de la neuroinflammation induite par une inflammation périphérique au LPS.

2. Résultats principaux

Dans cette étude, nous avons comparé les effets comportementaux et neuroinflammatoires induits par une injection périphérique de LPS chez des souris sauvages et invalidées pour le gène codant le récepteur 5-HT2B ($Htr2b^{-/-}$). Nous avons également étudié la contribution spécifique du récepteur 5-HT2B microglial en réitérant ces expériences sur des souris transgéniques spécifiquement invalidées pour ce récepteur dans les microglies ($Cx3cr1^{CreERT2/+}$; $Htr2b^{fl/fl}$) à la naissance et à l'âge adulte. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que :

- La délétion totale du récepteur 5-HT2B chez la souris augmente la perte de poids et diminue le comportement de toilettage après une injection périphérique de LPS.
- Forte réactivité des microglies à la suite d'une injection périphérique de LPS chez les souris $Htr2b^{-/-}$

- Forte réactivité des cultures primaires de microglies Htr2b^{-/-} après traitement au LPS : augmentation de l'expression de certains marqueurs de l'inflammation
- *In vivo*, une injection intrapéritonéale de LPS prolonge la neuroinflammation chez les souris Htr2b^{-/-}
- La délétion du récepteur 5-HT2B dans les microglies à la naissance est suffisante pour renforcer la perte de poids induite par le traitement au LPS

3. Conclusion

Une inflammation périphérique peut favoriser le déclin cognitif et la neurodégénérescence par modification à long terme de la microglie, cependant, les facteurs permettant de réguler le prolongement et la résolution de ces changements microgliaux restent inconnus. Cette étude nous a permis d'identifier le gène Htr2b comme étant un gène nécessaire pour terminer la neuroinflammation à la suite d'une inflammation périphérique au LPS. En effet, la délétion du récepteur 5-HT2B sensibilise les souris à une inflammation périphérique en augmentant l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoire dans le cerveau et provoque des altérations du comportement. La délétion du récepteur 5-HT2B dans les microglies à un stade postnatal précoce est suffisant pour exacerber l'effet du LPS sur les variations du poids, mais ces effets ne sont pas retrouvés chez la souris invalidée pour l'expression du récepteur à l'âge adulte. D'autre part, plusieurs cytokines restent fortement exprimées dans le cerveau 24 heures après l'induction d'une inflammation périphérique au LPS chez des souris invalidées pour le récepteur 5-HT2B et peuvent ainsi être utilisées comme des biomarqueurs d'une inflammation non résolue.

4. Contribution personnelle

Dans cette étude, j'ai réalisé une partie des extractions d'ARN à partir de cerveau de souris sauvages et Htr2b^{-/-} traitées avec une solution saline ou du LPS, leur préparation en ADNc ainsi que les PCR quantitative en temps réel pour les marqueurs Ccl6, Spp1 et Lcn2.

Serotonin 2B receptor instructs neonatal microglia to limit neuroinflammation and sickness behavior in adulthood.

Béchade, C^{1,2,3}, D'Andrea, I^{1,2,3,*}, Etienne, F^{1,2,3,*}, Verdonk, F⁴, Moutkine, I^{1,2,3}, Banas, S.M.^{1,2,3}, Kolodziejczak, M^{1,2,3,8}, Diaz, S.L.^{1,2,3,5}, Parkhurst, C.N.^{6,7}, Gan W.-B.⁶, Maroteaux, L^{1,2,3}, Roumier, A^{1,2,3}

¹INSERM UMR-S 839, F-75005, Paris, France

²Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 6, F-75005, Paris

³Institut du Fer à Moulin, F-75005, Paris

⁴Experimental Neuropathology, Infection and Epidemiology Department, Institut Pasteur, Paris, France

⁵current address: Instituto de Biología Celular y Neurociencia, UBA-CONICET - Paraguay 2155, 3º piso, C1121ABG Buenos Aires, Argentina

⁶Molecular Neurobiology Program, The Kimmel Center for Biology and Medicine at the Skirball Institute, Department of Neuroscience and Physiology, New York University School of Medicine, New York, NY 10016, USA;

⁷current address: Weill Cornell Medicine, New York, NY 10065, USA.

⁸current address: Department of Psychiatry, University of Geneva, Geneva, Switzerland; Department of Basic Neuroscience, University of Geneva, Geneva, Switzerland.

*equal contribution

• **Corresponding author's complete mailing address, phone, and email**

Anne Roumier ; INSERM UMR-S839, 17 rue du Fer à Moulin, Paris, 75005, France; Phone 33 1 45 87 61 24; Email: anne.roumier@inserm.fr

• **Short/running title**

Serotonin 2B receptor, microglia and sickness behavior

• **Six keywords**

Serotonin; 5-HT_{2B} receptor; microglia; LPS; sickness behavior; inflammation

• **Word count of the abstract: 233**

• **Word count of the main text: 4887**

• **Number of figures, 5 tables, 0 Supplemental information, 1 (5 Sup Fig and 2 sup Tables)**

Abstract

BACKGROUND: The mechanisms involved in resolution of neuroinflammation and microglial activation after a systemic inflammation remain elusive. Signaling mediated by the 5-HT_{2B} receptor, the main microglial serotonin receptor, might represent a valuable and yet unexplored candidate.

METHODS: To test this hypothesis, full and microglia-specific knock-out mice for the 5-HT_{2B} receptor gene (*Htr2b*) were exposed to a single peripheral LPS challenge, and sickness behavior (i.e. weight loss, reduced grooming), microglial activation, and markers of brain inflammation were evaluated.

RESULTS: LPS induced a stronger sickness response in *Htr2b*^{-/-} mice compared to wild-type. In addition, *Htr2b*^{-/-} microglia displayed an increased reactivity to LPS challenge *in vivo* and *in vitro*. Comparison of inflammatory markers in brain, 4 and 24h after LPS injection, showed that *Htr2b* deficiency leads to a prolonged neuroinflammation. To assess the specific contribution of the microglial 5-HT_{2B} receptor, we investigated the response to LPS in conditional knock-out mice invalidated for *Htr2b* in microglia only. We found that deletion of *Htr2b* in microglia from birth is sufficient to cause increased weight loss and enhanced neuroinflammatory response upon LPS injection. In contrast, mice deleted for microglial *Htr2b* in adulthood have a normal behavioral response to LPS.

CONCLUSION: Our results show that neonatal loss of microglial *Htr2b* amplifies the behavioral and neuroinflammatory response to a peripheral immune challenge in adulthood, suggesting the existence of a critical developmental period for instruction of microglia by 5-HT_{2B} receptors.

Introduction

In mice and humans, peripheral inflammation induces behavioral changes called sickness behaviors, which include anhedonia, decreased locomotion and reduction of the time dedicated to specific activities such as grooming, social interaction and food intake, for review see (1, 2). A major and robust outcome of sickness behaviors is weight loss in the days following the inflammatory stimulus. The changes in neuronal activity that mediate these physiological and behavioral adaptations can be induced by signals conveyed by the blood and the vagus nerve, and by microglia- the resident immune cells of the brain (1, 2).

Although generally transient and considered to be adaptive, sickness behaviors can have negative outcomes when prolonged, with unintentional weight loss being notably associated with increased mortality in elderly patients (3, 4). In case of an extreme systemic inflammatory response such as sepsis, epidemiological studies show that survivors have an increased risk of later depression and cognitive dysfunction (5).

Alterations in microglia have now been associated with most psychiatric and neurodegenerative disorders (for review see (6)), and the enduring modification of microglia may represent a cellular basis for the sensitizing effect of peripheral infection on the central nervous system (CNS) (7). Indeed, the existence of an innate immune memory in these cells has been recently acknowledged (8, 9).

To prevent an exaggerated behavioral or inflammatory response to systemic inflammation, which could compromise the quality of life of patients in a short or long-term manner, it is necessary to identify genetic and environmental factors controlling microglia activation and sickness behaviors. Among the candidates is the serotonin (5-Hydroxytryptamine, 5-HT) pathway, which lies at the interface between immune activation and the central nervous system (10). The *Htr2b* gene, which product is the 5-HT_{2B} receptor, is expressed in subsets of serotonin (11) and dopamine (12) neurons. It is critical to mediate behavioral traits and its absence is

correlated with impulsivity (13), hyperactivity and sleep disturbance (14), and resistance to selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) (11), although the precise cell subpopulations involved in these various phenotypes are not identified yet. Microglia also express the 5-HT_{2B} receptor (15), at least since postnatal day 3 in mice (P3) (16). In primary cultures of microglia, loss of *Htr2b* expression results in a basal overexpression of several inflammatory markers (16). Moreover, in human macrophages, the 5-HT_{2B} receptor is preferentially expressed by M2 versus M1 macrophages (17), and it mediates the effect of serotonin on the polarization and maintenance of some peripheral immune cells in an anti-inflammatory status (17, 18). Endly, in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), loss of *Htr2b* was associated with an acceleration of disease progression and an increased microglia degeneration at end-stage of the disease (19). Altogether, this suggests a role of this receptor in controlling microglial activation and differentiation. We thus postulated that the *Htr2b* gene might control sickness behaviors and neuroinflammation in response to a peripheral immune challenge.

To this aim, we compared the behavioral and neuroinflammatory effects of a peripheral injection of bacterial wall Lipopolysaccharide (LPS) in wild-type and 5-HT_{2B}-receptor full knock-out mice (*Htr2b*^{-/-} mice). We then analyzed the specific contribution of the microglial 5-HT_{2B} receptor by replicating these experiments in conditional knock-out mice, deleted for this gene in microglia only (*Cx3cr1*^{creERT2/+}; *Htr2b*^{fl/fl} mice), at birth or in adulthood. Our conclusions are that 1) loss of the *Htr2b* gene sensitizes mice to brain inflammation and behavioral alterations induced by a peripheral injection of LPS; 2) specific ablation of *Htr2b* in microglia at the early postnatal stage, but not in adulthood, is sufficient to exacerbate the effect of LPS on body weight, suggesting a role of a 5-HT to microglia signal during development; 3) several cytokines remain specifically elevated in the brain after peripheral inflammation in the absence of the 5-HT_{2B}-receptor and may be used as biomarkers of unresolved inflammation. Altogether, our results point to a role of 5-HT_{2B} receptor in instructing microglia during

development; the absence of this signal results in exaggerated weight loss and neuroinflammation in response to a peripheral immune challenge. Thereby, we identify *Htr2b* as a susceptibility gene for enhanced neuroinflammation, that may put individuals at risk for immune-dependent psychiatric disorders or modify the severity of neurodegenerative disease.

Methods and Material

Animals

Htr2b^{-/-} knockout mice (*129S2.Cg-Htr2b^{tm1Lum}/Htr2b^{tm1Lum}*) were generated and maintained on the 129S2/SvPas (referred to as 129S2 hereafter) background (20). Wild-type 129S2 mice were used as control. *Htr2b*^{fl/fl}, the *Htr2b* floxed mice (*Htr2b^{tm2Lum}/Htr2b^{tm2Lum}*), were generated as described (12, 21) with backcrossing on 129S2 background for >10 generations. *Cx3cr1^{CreER}* mice, which express tamoxifen-inducible Cre recombinase in microglia under the control of the endogenous *Cx3cr1* promoter, have been previously described (22) and were backcrossed on 129S2 background (with *Htr2b*^{fl/fl} mice) for >10 generations. Along the procedure, only *Cx3cr1^{CreER/+}* males were used for breedings. *Cx3cr1^{CreER/+}; Htr2b^{fl/fl}* were compared to *Cx3cr1^{+/+}; Htr2b^{fl/fl}* littermates. *Cx3cr1^{GFP}* mice (23) were backcrossed on 129S2 background for >10 generations and the line was crossed with *Htr2b*^{-/-} to obtain *Cx3cr1^{GFP/+}; Htr2b^{-/-}* mice. All the experiments presented in the study have been performed on adult males (3-10 months old), except in some Supplementary Figures which present data on adult (3-10 months old) females (Figure S1) and on aged (12-18 months old) males and females (Figure S2), and in flow cytometry experiments (Figures 2C and S3). Temperature was maintained at 21±1°C, under 12/12h light/dark. All mice were bred in our animal facility. Food and water were available *ad libitum*. Mice were moved to the experimental room in their home cage at least 5 days prior to testing to allow for habituation to the environment. Behavioral tests and animal care were conducted in accordance with the standard ethical guidelines (National Institutes of Health's 'Guide for the care and use of Laboratory animals' and European Directive 2010/63/UE). All experiments involving mice were approved by our local ethical committee (Darwin Committee, agreements #1170 and #10921).

Tamoxifen treatment

Cre-mediated recombination was induced as in (22). Briefly, neonatal recombination was induced by intragastric administration of 50 µg of tamoxifen (Sigma-Aldrich) per day for 3 consecutive days between P1(P0 being the day of birth) and P5 as described in (24). In adults, recombination was induced by two gavages with 10 mg of tamoxifen each, at a 48 hours interval. Adult mice were tested at least 1 month after gavage.

Induction of Sickness behavior

Mice were injected intraperitoneally with 0.2 mg/kg LPS (O55:B5, Sigma-Aldrich L-6529) or saline solution at 10:30 am. This dose induces a reliable expression of sickness behavior and >98% survival (data not shown). In all the tests (weight loss, splash test), the observer was blind to experimental conditions (treatment, genotype).

Body Weight variation

Mice were weighed daily at 10:30 am. Weight variation is expressed as percentage of the weight at the day of injection.

Splash test to induce grooming

7 hours after LPS or saline injection, mice in their home cage were sprayed with a 10 % sucrose solution on their back. The sucrose solution dirties the coat and induces grooming. As this is an organized behavior, it is possible to describe different levels of fur state depending on whether the hair remain lumped on the rear, the neck, and/or the middle of the back and to assign a specific score. A manipulator blind to the experimental conditions scored the fur state at different time points after the sucrose splash. Scores went from 3 (maximum amount of sucrose) to 0 (no sucrose left, fur as clean as before the splash). By fitting the recovery curves with

Prism7 GraphPad software (“Plateau followed by one phase decay”), we determined the "cleaning half-time " as the time to reach a score of 1.5. This parameter is convenient to compare saline and LPS-treated animals, as their different time-course of fur cleaning require using different time-points.

Quantification and morphological analysis of microglia:

To allow microglia imaging and analysis in thick slices without immunostaining, like in (25), morphological analysis was performed on *Cx3cr1^{GFP/+}; Htr2b^{+/+}* and *Cx3cr1^{GFP/+}; Htr2b^{-/-}* mice (adult males). 24h after saline or LPS injection, mice were killed by lethal injection of pentobarbital (Vetoquinol, France), the brains were immediately removed, cut in a trans-sagittal plane in the inter-hemispheric fissure, and cerebral hemispheres were fixed during 24 h in 4 % buffered paraformaldehyde (Sigma-Aldrich). Following fixation, tissue samples were sliced along a sagittal plane on a calibrated vibrating slicer (Microm 650V, ThermoScientific) into 100- μ m-thick free-floating slices. Image acquisition and processing were performed as described in (25). Briefly, sample areas from the whole hippocampus of the most medial slice (one per animal) were acquired using a spinning disc confocal system (CellVoyager CV1000, Yokogawa, Japan) with a UPLSAPO 40 \times /NA 0.9 objective. Mosaic, volume creation and maximum projection processing from confocal images were done using ImageJ v1.50 software and analysis performed with AcapellaTM image analysis software (version 2.7, PerkinElmer Technologies, Waltham, USA). The average number of microglia reconstructed per animal was 200. For each microglia, three morphological criteria were analysed: its cell environment area which represents the total surface covered by its ramifications and is calculated from the polygon formed by linking the extremities of its processes, its number of segments, a segment being defined as the length of process between two nodes, and its total ramification length.

Flow cytometry

Flow cytometry analysis were performed on adult mice 24h after injection with LPS or saline solution. Both males and females were used in this experiment, and we observed no difference between them in flow cytometry analysis (data not shown). Briefly, animals anesthetized with pentobarbital were perfused with ice-cold PBS, and whole brain (cerebellum and olfactory bulbs removed) suspensions were prepared with a combination of enzymatic and mechanic treatments (NTDK kit, Miltenyi Biotec). The suspension was strained through a 70 μ m nylon filter, centrifuged, then cells were resuspended in 4 ml 30% isotonic Percoll (Sigma-Aldrich) and covered with 6 ml of PBS. After centrifugation, pelleted cells were washed extensively in PBS and resuspended in FACS buffer (PBS 1% BSA, 1 mM EDTA). For the staining, Fc block was added 5 minutes prior to the relevant antibodies (listed in Table S1). After incubation with the fluorescent antibodies, cells were washed and DAPI (D1306, Invitrogen) was added. Flow cytometry analysis were performed on a VYB MacsQuant (Miltenyi Biotec).

Primary microglial cultures

Primary microglia were prepared from cortices of P0-P1 pups (*Htr2b*^{+/+} or *Htr2b*^{-/-}) as previously described (16, 26) and grown in DMEM (Invitrogen, France) with 10% heat-inactivated FCS (BioWest, France). Microglia were detached from the astrocytic layer between 12 and 14 days in vitro by gentle shaking and settled on 12-well plates. They were then activated with LPS (10 ng/ml) for 24 h.

Inflammatory Cytokines and Receptors Array.

Quantitative mRNA expression analysis in primary microglia cultures was performed with an inflammatory cytokines and receptors RT2 profiler PCR array (PAMM-011ZA, SABioscience, Qiagen), according to manufacturer's instructions. Briefly, total RNA was isolated from

primary microglia cultures using the RNeasy mini kit (Qiagen), 500 ng of RNA from each culture were converted to cDNA and quantitative PCRs were performed with the PCR array on a Stratagene Mx3005P (Agilent) apparatus. The mRNA expression of each gene was normalized using the expression of *Hsp90* and *Gapdh* as housekeeping genes and compared with the data obtained with the control group (*Htr2b*^{+/+} microglia cultures treated with LPS) according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Results are thus expressed as fold change from LPS-treated *Htr2b*^{+/+} microglia cultures. Statistical analysis was performed using the Qiagen web resource.

Quantitative real time PCR on brain tissue

4h or 24h after injection with LPS or 24h after saline injection, adult male mice were anesthetized with pentobarbital, perfused with ice-cold PBS, and the brains (cerebellum and olfactory bulbs removed) were extracted, frozen and kept at -80°C. Total RNAs was extracted using Trizol reagent (Invitrogen) and treated with DNase (Thermoscientific). First-strand cDNA was synthesized by reverse transcription of 2 µg of total RNA with Superscript-II reverse transcriptase (Invitrogen, Illkirch, France). Reverse transcriptase was omitted in some samples as negative control. Primers were designed with PrimerBlast (NCBI) (listed in Table S2). Relative expression levels of mRNAs were determined by real time RT-PCR using Absolute SYBR Green Mix (Thermoscientific) on a QuantStudio apparatus (Applied Biosystems). Efficiency of amplification for each primer pair was checked on a standard curve. Gene expression levels were normalized to mouse cyclophilin B mRNA expression using the $2^{-\Delta Ct}$ method.

Statistical analysis

Means and SEM are represented in all graphs. The statistical tests, indicated in each figure, were performed with Prism7 (GraphPad software).

Results

Loss of *Htr2b* exacerbates weight loss and decrease in grooming induced by a peripheral LPS injection.

Intraperitoneal injection of LPS in rodents triggers a sickness response which includes a reduced food intake and weight loss (27). To assess if *Htr2b* deficiency impacted sickness response in mice, we first measured the weight variation of *Htr2b*^{+/+} and *Htr2b*^{-/-} adult male mice 24h after an i.p injection of LPS or saline solution. We observed a significantly larger weight loss in *Htr2b*^{-/-} than in wild-type male mice after LPS injection (**Fig. 1A**; mean weight loss 24h after LPS: *Htr2b*^{-/-}: $-5.9 \pm 0.6\%$ vs *Htr2b*^{+/+}: $-3.7 \pm 0.4\%$). Additional experiments showed no effect of genotype in the time-course of weight recovery (**Fig. 1B**). As a read-out of an altered motivation state in response to inflammation (1), we investigated grooming behavior after a sucrose splash, a test used in animal models of depression and anxiety (28, 29). We performed this test seven hours after LPS injection. Fur coat was scored visually on a scale from 3 - maximum amount of sucrose remaining- to 0 - no sucrose left. An analysis of cleaning kinetics revealed a significant reduction of grooming efficacy in LPS-treated *Htr2b*^{-/-} compared to wild-type mice (**Fig. 1C**; significant effect of genotype at 20, 30, and 60 min). By fitting these curves, we also determined the time necessary to reach a score of 1.5, or "cleaning half-time". In the saline treated mice cleaning half-time was approximately 3 min in both genotypes. However there was a significant difference between genotypes in the LPS condition: cleaning half-time was then extended to 19.5 ± 4.0 min in wild-type and 41 ± 7 min in *Htr2b*^{-/-} mice (**Fig. 1D**; $p=0.0064$). Similar experiments were conducted on adult females and showed that, as in males, the absence of *Htr2b* gene enhanced the effect of LPS injection on weight and grooming (**Fig. S1A-C**). As systemic inflammations are more frequent and detrimental in aged people, we also analyzed whether the effect of *Htr2b* deficiency was maintained with ageing. In 12-18 months

old mice, lack of *Htr2b* similarly exacerbated the effects of LPS on body weight and grooming, in both males (**Fig. S2 A, C**), and females (**Fig. S2 B, D**). Moreover, in aged males, differences between *Htr2b*^{-/-} and *Htr2b*^{+/+} mice were protracted and still visible at D+2 for weight loss (**Fig. S2 A**) and at D+4 for grooming (**Fig. S2 C**). These experiments demonstrate that loss of *Htr2b* gene sensitizes animals to sickness response, regardless of sex or age group.

Stronger reactivity of microglia to peripheral LPS injection in *Htr2b*^{-/-} mice

In addition to activating the peripheral immune system, peripheral immune challenges induce changes in microglia inflammatory markers (30, 31) and morphology (32). We thus investigated whether the exacerbated sickness behavior in *Htr2b*^{-/-} mice was correlated with an increased microglial activation. As an initial approach, we performed an in-depth analysis of microglia morphology in the hippocampus, a region where microglial, neuronal and neurochemical changes upon peripheral inflammation are prominent (30, 31, 33-35). We used an automated acquisition, reconstruction and analysis program (25) to analyze morphological parameters on more than 800 microglia per experimental condition. We observed that three morphological parameters were significantly increased by LPS treatment in *Htr2b*^{-/-} mice: the area covered by individual microglia (p=0.030), the number of segments per microglia (p=0.046), and the total ramification length of microglia processes (p=0.028) (**Fig. 2A-B**). In contrast, none of these parameters were altered by LPS in *Htr2b*^{+/+} mice, nor different among the saline-treated groups. As a second approach, we examined the surface expression level of several microglial proteins by flow cytometry. Consistent with the morphological analysis, whereas none of the markers was significantly modified by LPS in control *Htr2b*^{+/+} mice (**Fig. 2C, left**), the levels of Siglec-H, Trem2, and CD45 were altered by LPS in *Htr2b*^{-/-} microglia (p=0.023, p=0.022, and p=0.030, respectively) (**Fig. 2C, right**). There was no significant difference between microglia from *Htr2b*^{+/+} and *Htr2b*^{-/-} mice treated with saline only (**Fig. S3**).

Altogether, these results show that the loss of *Htr2b* results in a stronger reactivity of microglia 24h after LPS injection.

Stronger reactivity of *Htr2b*^{-/-} primary microglial cultures to LPS

We have previously shown that, in culture, *Htr2b*^{-/-} microglia overexpress some cytokine receptor genes (16), indicating that *Htr2b* deficiency leads to an activated phenotype in microglia. To determine whether *Htr2b*^{-/-} microglia are intrinsically more responsive to LPS than *Htr2b*^{+/+} microglia, we performed a screen for inflammatory markers on primary microglia cultures prepared from *Htr2b*^{+/+} and *Htr2b*^{-/-} neonates. Cultures were incubated with LPS for 24h and a quantitative mRNA expression analysis of 84 cytokines and receptors related to inflammation was conducted. 46 genes reached the detection threshold among which five, *Ccl6*, *Tnfrsf11b*, *Spp1*, *Csf1*, and *Ccl9*, showed significant increases in the LPS-treated *Htr2b*^{-/-} versus *Htr2b*^{+/+} microglia cultures (**Fig. 3A**). These data suggest that the absence of *Htr2b* skews microglia into a sensitive state characterized by an increased and particular response to LPS treatment.

Prolonged neuroinflammation in *Htr2b*^{-/-} mice after LPS treatment

We then analyzed these 5 markers by quantitative RT-PCR (qPCR), in the brain of *Htr2b*^{+/+} and *Htr2b*^{-/-} mice 4h and 24h after LPS or saline injection. We also assessed expression of Lipocalin-2 (*Lcn2*), Tnf- α (*Tnfa*) and Interleukin-6 (*Il6*), which are known to be strongly induced by LPS (36, 37). In control conditions (saline injection), there was no difference between *Htr2b*^{+/+} and *Htr2b*^{-/-} brains (**Fig. 3B** and **S4**). Four hours after LPS injection, the expression of most of the tested genes had changed, but still with no difference between *Htr2b*^{+/+} and *Htr2b*^{-/-} brains. In contrast, 24h after LPS, a significant difference was noted: in *Htr2b*^{+/+} brains most markers had returned to or remained similar to saline levels, in *Htr2b*^{-/-}

brains, *Spp1*, *Ccl6* and *Lcn2* remained elevated in comparison with their saline group and were significantly overexpressed in comparison with the LPS-treated *Htr2b*^{+/+} mice (**Fig. 3B**). Expression level of *Tnfa* remained elevated in both genotypes, and *Tnfrsf11b* decreased in wild-type but not in mutant mice. In conclusion, these data showed that the exaggerated sickness behavior observed in *Htr2b*^{-/-} mice is associated with a prolonged induction of a subset of inflammatory markers in brain (*Spp1*, *Ccl6*, *Lcn2*). Together with the morphological and flow cytometry analysis, this suggested a prolonged activation of microglia in *Htr2b*^{-/-} mice in response to peripheral LPS injection. So we next questioned whether microglia impairment was responsible for the defects seen in the *Htr2b*^{-/-} full knock-out mice.

A targeted and early deletion of *Htr2b* in microglia is sufficient to enhance the LPS-induced weight loss but not the decrease in grooming.

Htr2b gene expression has been described in microglia (15, 16) but also in serotonergic (11) and dopaminergic (12) neurons, as well as in subsets of activated cells of the myeloid lineage in humans (17, 18). Thus, to determine if the effect of *Htr2b* deletion on sickness behavior and neuroinflammation was specifically dependent on the microglial 5-HT_{2B} receptors, we generated mice deleted for the *Htr2b* gene only in microglia. To this aim, *Cx3cr1*^{CreERT2/+} mice (22) were crossed with *Htr2b*^{fl/fl} mice (12). We first investigated the effects of early loss of microglial 5-HT_{2B} by tamoxifen treatment of neonates, followed by injection of LPS or saline at 2-4 months of age (**Fig. 4A**). It has been shown previously that this protocol results in adult mice bearing recombination only in long-lived self-renewing microglial cells, whereas peripheral cells from the monocytic/macrophage lineage have been repopulated from normal, non-recombined, immune progenitors (22). To ensure microglial-specific deletion of the *Htr2b* locus, we sorted microglia and determined by qPCR that recombination at the *Htr2b* locus occurred specifically in microglia and not in other brain cells (**Fig. S5A-B**). We then analyzed

the sickness response in *Cx3cr1^{CreERT2/+}; Htr2b^{fl/fl}* mice and control littermates, all treated with tamoxifen at birth. We observed that weight loss 24h after LPS injection was significantly enhanced in the absence of microglial *Htr2b* (p=0.0082) (**Fig. 4B**), similar to the results in *Htr2b^{-/-}* full knock-out mice (**Fig. 1A**). The effect was even more pronounced, as weight variations were still significantly different between *Cx3cr1^{CreERT2/+}; Htr2b^{fl/fl}* mice and their littermates two days after LPS treatment (p=0.004 at D+2) (**Fig. 4C**). In contrast, microglial-specific deletion of *Htr2b* did not induce the stronger grooming decrease (**Fig. 4D**). Thus, weight loss at 24h is significantly exacerbated and its recovery is delayed by the neonatal deletion of the *Htr2b* gene in microglia, whereas the early grooming decrease, analyzed at 7h post treatment, is normal.

A targeted and early deletion of *Htr2b* in microglia is sufficient to sensitize to LPS-induced neuroinflammation.

We next examined expression of the inflammatory markers in the brains of *Cx3cr1^{CreERT2/+}; Htr2b^{fl/fl}* and control mice. We focused on the condition in which differences of mRNA levels had been observed, i.e. 24h post-LPS. Strikingly, we found, as in *Htr2b^{-/-}* mice, a significant overexpression of *Spp1* (p=0.016) and *Ccl6* (p=0.027) in *Cx3cr1^{CreERT2/+}; Htr2b^{fl/fl}* brains compared to controls. Furthermore, mRNA levels of *Csf1* (p=0.009) and *Tnfrsf11b* (p=0.036) were also significantly higher. Finally, mRNA levels of *Lcn-2* and *Ccl9* were slightly although not significantly increased in *Cx3cr1^{CreERT2/+}; Htr2b^{fl/fl}* mice (**Fig. 4E**). Altogether, these data show that the enhanced weight loss observed in *Cx3cr1^{CreERT2/+}; Htr2b^{fl/fl}* mice following LPS injection is associated with an increase of multiple markers of central nervous system inflammation.

Deletion of microglial *Htr2b* in adulthood does not sensitize to LPS-induced weight loss.

The effects reported above show that the loss of microglial *Htr2b* from the early postnatal period sensitizes mice to the effects of peripheral LPS injection, in terms of both weight loss and expression of neuroinflammation-associated genes. To determine whether microglial 5-HT_{2B} receptors are important during development or at the time of the sickness episode, we induced *Htr2b* recombination in adulthood. To this aim, adult *Cx3cr1^{CreERT2/+}; Htr2b^{fl/fl}* mice underwent tamoxifen gavage and were injected with LPS or saline solution at least one month later (**Fig. 5A**). We checked that this protocol was as efficient as neonatal treatment to induce gene recombination (**Fig. S5C**). In this condition, *Cx3cr1^{CreERT2/+}; Htr2b^{fl/fl}* exhibited the same weight variation and kinetics of recovery upon LPS injection as their control littermates (**Fig. 5B-C**), in contrast with the enhanced weight loss observed when microglial *Htr2b* had been removed neonatally (Fig. 4A-C). Altogether, these results indicate that the presence of microglial 5-HT_{2B} receptor during development is essential to limit weight loss and ensure a proper recovery after a peripheral inflammation in adulthood. They also indicate that the weight variation at the time of the inflammatory stimulus is not dependent upon an acute 5-HT_{2B} receptor-mediated signal.

Discussion

One possible mechanism by which peripheral immune challenge may favor cognitive decline and neurodegeneration is long-lasting modification of microglia, but the factors regulating the extent and resolution of these microglial changes remain elusive. In this study, we identify *Htr2b* as a gene whose absence enhances microglial activation and prolongs brain neuroinflammation after a peripheral LPS injection, in parallel with amplifying weight loss. Moreover, our results suggest the existence of a critical neonatal period for the instruction of microglia through 5-HT_{2B} receptor. Indeed, the presence of microglial *Htr2b* is required at birth, and not in adulthood, for the development of a timely response to a peripheral immune challenge.

***Htr2b*, a susceptibility gene for the effects of a peripheral immune challenge**

We showed that the absence of *Htr2b* enhances the severity of LPS-induced weight loss and neuroinflammation. Genes encoding other membrane proteins such as CX3CR1 (30), IL-1R (38), and the dimerization of glucocorticoid receptors (39), have previously been shown to control the severity of sickness behaviors. However, it is worth noting that these genes have different expression patterns, and their impacts on sickness behaviors vary. For example, *Cx3cr1* is expressed not only in microglia but also in peripheral immune cells, and *Cx3cr1* knock-out mice show no enhancement of weight loss (30). Glucocorticoid and interleukin-1 receptors are also expressed in cells both in and outside of the brain. Therefore, these genes are likely not all involved in the same steps or pathways and the cellular mode of action of each has to be refined. In contrast to these studies, the use of microglial-specific gene deletion allowed to specifically assess the contribution of microglial *Htr2b*. Our results suggest that the increased severity of LPS-induced weight loss and neuroinflammation we observed in the absence of *Htr2b* is due to the specific loss of this gene in microglial cells.

Developmental role of microglial *Htr2b* in the regulation of microglia reactivity.

Serotonin turnover in the brain is altered by inflammation (30, 40). An appealing hypothesis was thus that the enhanced effects of LPS in the absence of microglial 5-HT_{2B} receptor resulted from a lack of detection of an acute serotonin signal, important to terminate microglial activation and sickness. However, in contrast to mice deleted for *Htr2b* since birth, mice deleted for this gene in adulthood respond normally to LPS. Thus, in the model of peripheral LPS injection, the microglial 5-HT_{2B} receptor is required during development, and not at the time of acute inflammation, to limit sickness behavior. This suggests that a serotonin signal conveyed by microglial 5-HT_{2B} receptor instructs neonatal microglia. This is consistent with our previous observation that microglia express the *Htr2b* gene at least from postnatal day 3 and respond morphologically to serotonin application in slices from the brains of young mice (16). In the absence of this developmental signal, microglia seem to acquire a particular status characterized by an increased propensity to get activated by LPS *in vitro* in primary cultures from neonates, and *in vivo* in adulthood, which is associated with an enhanced severity of the sickness episode. It should be noted that in addition to the intrinsic and cell-autonomous changes in microglia, supported by our experiments on *Htr2b*^{-/-} primary cultures, the neonatal deletion of microglial *Htr2b* could also have consequences on other cells in the brain, and result in some defective neuronal circuits. These other alterations could also contribute indirectly to the increased sensitivity to peripheral immune challenges.

Decrease of grooming after LPS, a *Htr2b*-dependent but microglial *Htr2b*-independent behavior.

We observed an exaggerated grooming decrease in *Htr2b*^{-/-} null mice, but not in mice with a microglial-specific deletion of *Htr2b*. This indicates that the effect observed in *Htr2b*^{-/-} null mice results from an impairment of non-microglial cells expressing *Htr2b*, such as peripheral

immune cells of the myeloid lineage (17, 18) or serotonergic or dopaminergic neurons (11, 12). Interestingly, at later time points, and in a different kind of peripheral immune challenge, the role of peripheral monocytes has been acknowledged in inflammation-induced cognitive changes (41), underlying the cross-contribution of several cell types in the complex effects of peripheral inflammation.

Significance and perspectives

We studied a model of acute systemic inflammation induced by a single injection of LPS. In mice, it was recently shown that a single LPS injection at a dose slightly higher than the one we used (0.5 vs 0.2 mg/kg) induces a microglia innate memory, which, months later, enhances the accumulation of plaques and load of A β peptide in a model of Alzheimer disease (9). Thus, the absence of *Htr2b*, by preventing a rapid resolution of microglia activation and an “immune resilience”, may impact on innate memory induced by LPS, although this will have to be tested in further experiments. More generally, sickness behaviors are observed in acute inflammation but are also common in chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and inflammatory bowel disease, significantly impairing the quality of life of the patients. Further investigations will be required to determine if microglia and *Htr2b* are also involved in sickness behavior in these chronic disease (42), and thus could be targeted for the relief of patients.

Our data demonstrate that *Htr2b*^{-/-} mice are more sensitive than wild-type mice to a peripheral immune challenge, and we propose that this is in part linked to the intrinsic increased reactivity of microglia in the absence of 5-HT_{2B}R. Such microglial impairment may impact the trajectory of chronic neuronal disease. In this line, it has been shown recently that lack of *Htr2b* resulted in dystrophic microglia and accelerated the progression of ALS in a mouse model of the disease and that conversely in a cohort of ALS patients, a SNP in *HTR2B* was correlated with increased *HTR2B* expression and longer survival (19).

Importantly, we show here that *Htr2b* must be invalidated neonatally to enhance late microglial reactivity and behavioral response to LPS. It is known that modifying serotonin levels in the early postnatal period induces long term effects on behavior both in humans and in rodents, for review see (43, 44). For example, early exposure to selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI), which increases serotonin level, favors anxiety in adulthood, while early tryptophan depletion decreases social interactions (45-47), for review see (48, 49). Our results suggest that such early changes in serotonin level may also alter microglia development and impair later their sensitivity to peripheral inflammation or chronic stress. It will be interesting, in the future, to test whether mice exposed to SSRI or tryptophan depletion in the neonatal period have altered sickness behavior and stress response, and if microglia can be targeted to prevent some of the long-term effects of these treatments.

Acknowledgment.

This work has been supported in part by funds from the *Centre National de la Recherche Scientifique*, the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*, the *Sorbonne Université Sciences - Pierre et Marie Curie (Emergence-UPMC program 2011/2014)*, and by grants from the *Fondation pour la Recherche sur le Cerveau*, the *Fondation de France*, the *Fondation pour la Recherche Médicale "Equipe FRM DEQ2014039529"*, the French Ministry of Research (Agence Nationale pour la Recherche ANR-17-CE16-0008 and the Investissements d'Avenir programme ANR-11-IDEX-0004-02) and the DIM Cerveau et Pensée from Region Ile de France (PME 2012, Neurocytometrie project) for cytometry equipment. The flow cytometry-based cell sorter has been acquired through the support of Bio-Psy Labex (ANR-11-IDEX-0004-02). LM's team is part of the École des Neurosciences de Paris Ile-de-France network and of the Bio-Psy Labex and as such this work was supported by French state funds managed by the ANR within the Investissements d'Avenir programme under reference ANR-11-IDEX-0004-02.

We thank Giulia Albertini and Patricia Gaspar for the fruitful discussions and suggestions. We thank Theano Eirinopoulou and Mythili Savariradjane for their help at the IFM Imaging facility, and François Baudoin and Gaël Grannec at the IFM animal facility. We would also like to thank the students Ezequiel Aranda, Damien Blot, Elodie Stievenard, Rayhan Haddad.

Disclosure.

The authors have nothing to disclose.

References

1. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW (2008): From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 9:46-56.
2. Rivest S (2009): Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol.* 9:429-439.
3. Stajkovic S, Aitken EM, Holroyd-Leduc J (2011): Unintentional weight loss in older adults. *Canadian Medical Association Journal.* 183:443-449.
4. Alibhai SMH, Greenwood C, Payette H (2005): An approach to the management of unintentional weight loss in elderly people. *Canadian Medical Association Journal.* 172:773-780.
5. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM (2010): Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA.* 304:1787-1794.
6. Tay TL, Béchade C, D'Andrea I, St-Pierre M-K, Henry MS, Roumier A, et al. (2018): Microglia Gone Rogue: Impacts on Psychiatric Disorders across the Lifespan. *Frontiers in Molecular Neuroscience.* 10:421.
7. Perry VH, Holmes C (2014): Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nature reviews Neurology.* 10:217-224.
8. Netea MG, Joosten LAB, Latz E, Mills KHG, Natoli G, Stunnenberg HG, et al. (2016): Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science.* 352:aaf1098.
9. Wendeln A-C, Degenhardt K, Kaurani L, Gertig M, Ulas T, Jain G, et al. (2018): Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks. *Nature.* 556:332-338.
10. Baganz NL, Blakely RD (2013): A dialogue between the immune system and brain, spoken in the language of serotonin. *ACS Chem Neurosci.* 4:48-63.
11. Diaz SL, Doly S, Narboux-Nême N, Fernandez S, Mazot P, Banas S, et al. (2012): 5-HT2B receptors are required for serotonin-selective antidepressant actions. *Mol Psychiatry.* 17:154-163.
12. Doly S, Quentin E, Eddine R, Tolu S, Fernandez S, Bertran-Gonzalez J, et al. (2017): Serotonin 2B receptors in mesoaccumbens dopamine pathway regulate cocaine responses. *J Neuroscience.* 37:10372-10388.
13. Bevilacqua L, Doly S, Kaprio J, Yuan Q, Tikkanen R, Paunio T, et al. (2010): A population-specific HTR2B stop codon predisposes to severe impulsivity. *Nature.* 468:1061-1066.
14. Pitychoutis P, Belmer A, Moutkine I, Adrien J, Maroteaux L (2015): Mice lacking the serotonin Htr2B receptor gene present an antipsychotic-sensitive schizophrenic-like phenotype. *Neuropsychopharmacology.* 40:2764-2773.
15. Krabbe G, Matyash V, Pannasch U, Mamer L, Boddeke HWGM, Kettenmann H (2012): Activation of serotonin receptors promotes microglial injury-induced motility but attenuates phagocytic activity. *Brain Behav Immun.* 26:419-428.
16. Kolodziejczak M, Béchade C, Gervasi N, Irinopoulou T, Banas SM, Cordier C, et al. (2015): Serotonin modulates developmental microglia via 5-HT2B receptors: potential implication during synaptic refinement of retinogeniculate projections. *ACS Chem Neurosci.* 6:1219-1230.
17. de Las Casas-Engel M, Domínguez-Soto A, Sierra-Filardi E, Bragado R, Nieto C, Puig-Kroger A, et al. (2013): Serotonin skews human macrophage polarization through HTR2B and HTR7. *J Immunol.* 190:2301-2310.

18. Szabo A, Gogolak P, Koncz G, Foldvari Z, Pazmandi K, Miltner N, et al. (2018): Immunomodulatory capacity of the serotonin receptor 5-HT2B in a subset of human dendritic cells. *Scientific reports*. 8:1765.
19. El Oussini H, Bayer H, Scekcic-Zahirovic J, Vercruysse P, Sinniger J, Dirrig-Grosch S, et al. (2016): Serotonin 2B receptor slows disease progression and prevents degeneration of spinal cord mononuclear phagocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 131:465-480.
20. Nebigil CG, Choi D-S, Dierich A, Hickel P, Le Meur M, Messaddeq N, et al. (2000): Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:9508-9513.
21. Belmer A, Quentin E, Diaz SL, Guiard BP, Fernandez SP, Doly S, et al. (2018): Positive regulation of raphe serotonin neurons by serotonin 2B receptors. *Neuropsychopharmacology*. 43:1623–1632.
22. Parkhurst C N, Yang G, Ninan I, Savas J N, Iii J RY, Lafaille J J, et al. (2013): Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell*. 155:1596-1609.
23. Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, et al. (2000): Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol*. 20:4106-4114.
24. Pitulescu ME, Schmidt I, Benedito R, Adams RH (2010): Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice. *Nat Protoc*. 5:1518-1534.
25. Verdonk F, Roux P, Flamant P, Fiette L, Bozza FA, Simard S, et al. (2016): Phenotypic clustering: a novel method for microglial morphology analysis. *J Neuroinflamm*. 13:153.
26. Roumier A, Pascual O, Bechade C, Wakselman S, Poncer JC, Real E, et al. (2008): Prenatal activation of microglia induces delayed impairment of glutamatergic synaptic function. *PLoS ONE*. 3:e2595.
27. Yirmiya R (1996): Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. *Brain Research*. 711:163-174.
28. Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G, et al. (2008): Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol Psychiatry*. 64:293-301.
29. David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang J-W, Marsteller D, Mendez I, et al. (2009): Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron*. 62:479-493.
30. Corona AW, Huang Y, O'Connor JC, Dantzer R, Kelley KW, Popovich PG, et al. (2010): Fractalkine receptor (CX3CR1) deficiency sensitizes mice to the behavioral changes induced by lipopolysaccharide. *J Neuroinflamm*. 7:93.
31. Wohleb ES, Fenn AM, Pacenta AM, Powell ND, Sheridan JF, Godbout JP (2012): Peripheral innate immune challenge exaggerated microglia activation, increased the number of inflammatory CNS macrophages, and prolonged social withdrawal in socially defeated mice. *Psychoneuroendocrinology*. 37:1491-1505.
32. Kozlowski C, Weimer RM (2012): An automated method to quantify microglia morphology and application to monitor activation state longitudinally in vivo. *PloS one*. 7:e31814.
33. Riazi K, Galic MA, Kuzmiski JB, Ho W, Sharkey KA, Pittman QJ (2008): Microglial activation and TNFalpha production mediate altered CNS excitability following peripheral inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:17151-17156.
34. D'Mello C, Riazi K, Le T, Stevens KM, Wang A, McKay DM, et al. (2013): P-selectin-mediated monocyte-cerebral endothelium adhesive interactions link peripheral organ inflammation to sickness behaviors. *J Neurosci*. 33:14878-14888.

35. Albertini G, Deneyer L, Ottestad-Hansen S, Zhou Y, Ates G, Walrave L, et al. (2018): Genetic deletion of xCT attenuates peripheral and central inflammation and mitigates LPS-induced sickness and depressive-like behavior in mice. *Glia*. 43:98.
36. Ip JPK, Noçon AL, Hofer MJ, Lim SL, Müller M, Campbell IL (2011): Lipocalin 2 in the central nervous system host response to systemic lipopolysaccharide administration. *J Neuroinflam.* 8:124.
37. Cazareth J, Guyon A, Heurteaux C, Chabry J, Petit-Paitel A (2014): Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: importance of CCR2/CCL2 signaling. *J Neuroinflam.* 11:132.
38. Zhu C-B, Lindler KM, Owens AW, Daws LC, Blakely RD, Hewlett WA (2010): Interleukin-1 Receptor Activation by Systemic Lipopolysaccharide Induces Behavioral Despair Linked to MAPK Regulation of CNS Serotonin Transporters. *Neuropsychopharmacology*. 35:2510-2520.
39. Silverman MN, Mukhopadhyay P, Belyavskaya E, Tonelli LH, Revenis BD, Doran JH, et al. (2013): Glucocorticoid receptor dimerization is required for proper recovery of LPS-induced inflammation, sickness behavior and metabolism in mice. *Mol Psychiatry*. 18:1006-1017.
40. Dunn AJ (2006): Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. *Clinical neuroscience research*. 6:52-68.
41. Garré JM, Silva HM, Lafaille JJ, Yang G (2017): CX3CR1⁺ monocytes modulate learning and learning-dependent dendritic spine remodeling via TNF- α . *Nature Medicine*. 23:714-722.
42. D'Mello C, Le T, Swain MG (2009): Cerebral Microglia Recruit Monocytes into the Brain in Response to Tumor Necrosis Factor Signaling during Peripheral Organ Inflammation. *J Neurosci*, pp 2089-2102.
43. Shah R, Courtiol E, Castellanos FX, Teixeira CM (2018): Abnormal Serotonin Levels During Perinatal Development Lead to Behavioral Deficits in Adulthood. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 12:114.
44. Teissier A, Soiza-Reilly M, Gaspar P (2017): Refining the Role of 5-HT in Postnatal Development of Brain Circuits. *Frontiers in cellular neuroscience*. 11:139.
45. Zhang L, Guadarrama L, Corona-Morales AA, Vega-Gonzalez A, Rocha L, Escobar A (2006): Rats subjected to extended L-tryptophan restriction during early postnatal stage exhibit anxious-depressive features and structural changes. *J Neuropathol Exp Neurol*. 65:562-570.
46. Zoratto F, Fiore M, Ali SF, Laviola G, Macri S (2013): Neonatal tryptophan depletion and corticosterone supplementation modify emotional responses in adult male mice. *Psychoneuroendocrinology*. 38:24-39.
47. Rok-Bujko P, Krząścik P, Szyndler J, Kostowski W, Stefański R (2012): The influence of neonatal serotonin depletion on emotional and exploratory behaviours in rats. *Behavioural brain research*. 226:87-95.
48. Kepser L-J, Homberg JR (2015): The neurodevelopmental effects of serotonin: a behavioural perspective. *Behavioural brain research*. 277:3-13.
49. Brummelte S, Mc Glanaghy E, Bonnin A, Oberlander TF (2017): Developmental changes in serotonin signaling: Implications for early brain function, behavior and adaptation. *Neuroscience*. 342:212-231.

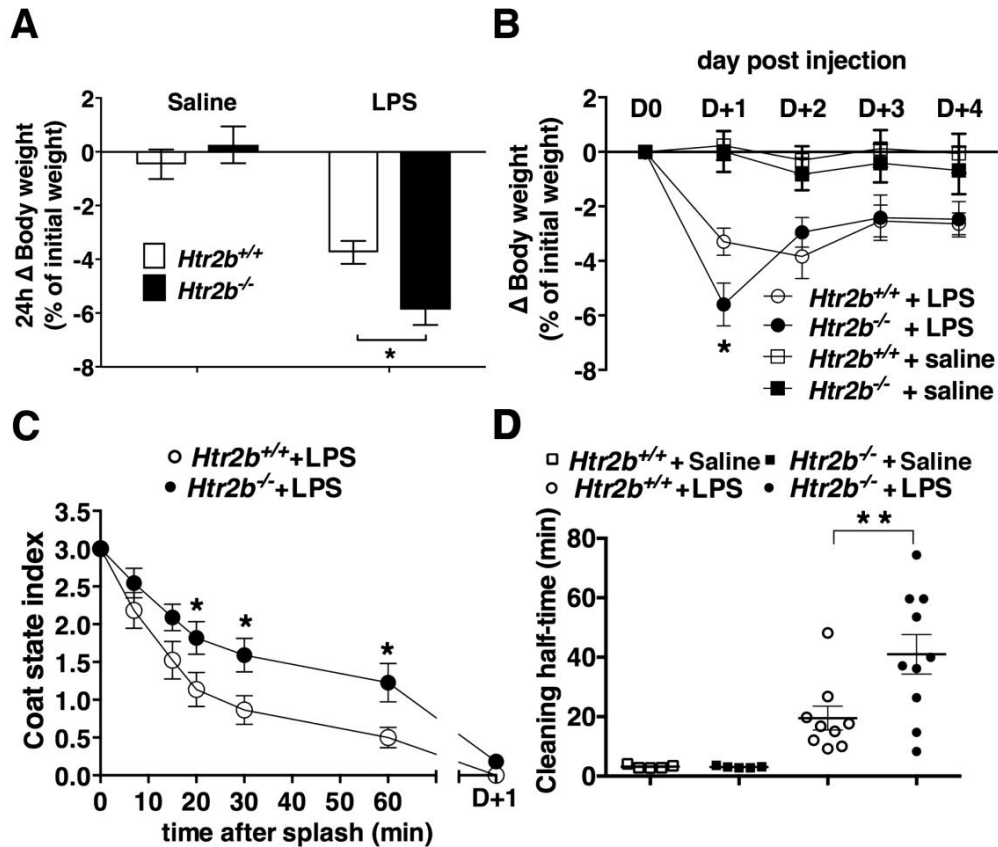


Figure 1 : Sickness syndrome is exacerbated in the absence of *Htr2b* in adult male mice. (A) Weight variation at 24h after injection. The weight loss after LPS injection was higher in *Htr2b*^{-/-} (filled bar) than in *Htr2b*^{+/+} (white bar) mice. Two-way ANOVA indicated a significant interaction between genotype and treatment ($F_{1,64} = 6.63$, $p=0.0124$) and post hoc Bonferroni's multiple comparison indicated a significant difference between LPS-treated group: * $p=0.016$; $n= 18$ *Htr2b*^{+/+}+saline, 15 *Htr2b*^{-/-} +saline, 21 *Htr2b*^{+/+}+LPS and 14 *Htr2b*^{-/-}+LPS. (B) Time-course of weight variation after LPS (circles) or saline (squares) injection in *Htr2b*^{+/+} (open symbols) and *Htr2b*^{-/-} (filled symbols) mice. Two-way ANOVA with repeated measures (RM) indicated a significant interaction between time and treatments ($F_{4,96} = 8.89$, $p=0.0056$) and post hoc Bonferroni's multiple comparison indicated a stronger weight loss in *Htr2b*^{-/-} than in *Htr2b*^{+/+} mice at D+1 post LPS: * $p=0.044$; $n= 14$ mice *Htr2b*^{+/+}+saline, 13 *Htr2b*^{-/-}+saline, 17 *Htr2b*^{+/+}+LPS, 9 *Htr2b*^{-/-}+LPS. (C) Quoting the coat state at regular times after splashing the mice with a sucrose solution (index=3: maximum amount of sucrose; index=0: no sucrose left) revealed a reduced grooming in *Htr2b*^{-/-} compared to *Htr2b*^{+/+} mice after LPS injection. Two-way ANOVA RM indicated a significant interaction between time and genotype ($F_{7,140} = 2.85$, $p=0.0082$), Bonferroni's post-hoc test indicated a significant difference between genotypes: * $p=0.040$, $p=0.022$, $p=0.022$ at 20, 30, and 60 min post-splash; $n=11$ *Htr2b*^{+/+} and 11 *Htr2b*^{-/-}. (D) "Cleaning half-time" is the time to reach a coat index of 1.5. This parameter, which is more convenient to compare saline and LPS-treated animals, is also increased after LPS injection in *Htr2b*^{-/-} compared to *Htr2b*^{+/+} mice. Two-way ANOVA indicated a main effect of treatment ($F_{1,25} = 23.40$, $p=<0.0001$), Bonferroni's post-hoc indicated a significant difference between *Htr2b*^{+/+}+LPS and *Htr2b*^{-/-}+LPS: ** $p=0.0064$; $n= 5$ *Htr2b*^{+/+}+saline, 5 *Htr2b*^{-/-}+saline, 9 *Htr2b*^{+/+}+LPS, 10 *Htr2b*^{-/-}+LPS. Data pooled from 2 (C) or 3 (A, B, D) independent experiments. Means \pm SEM.

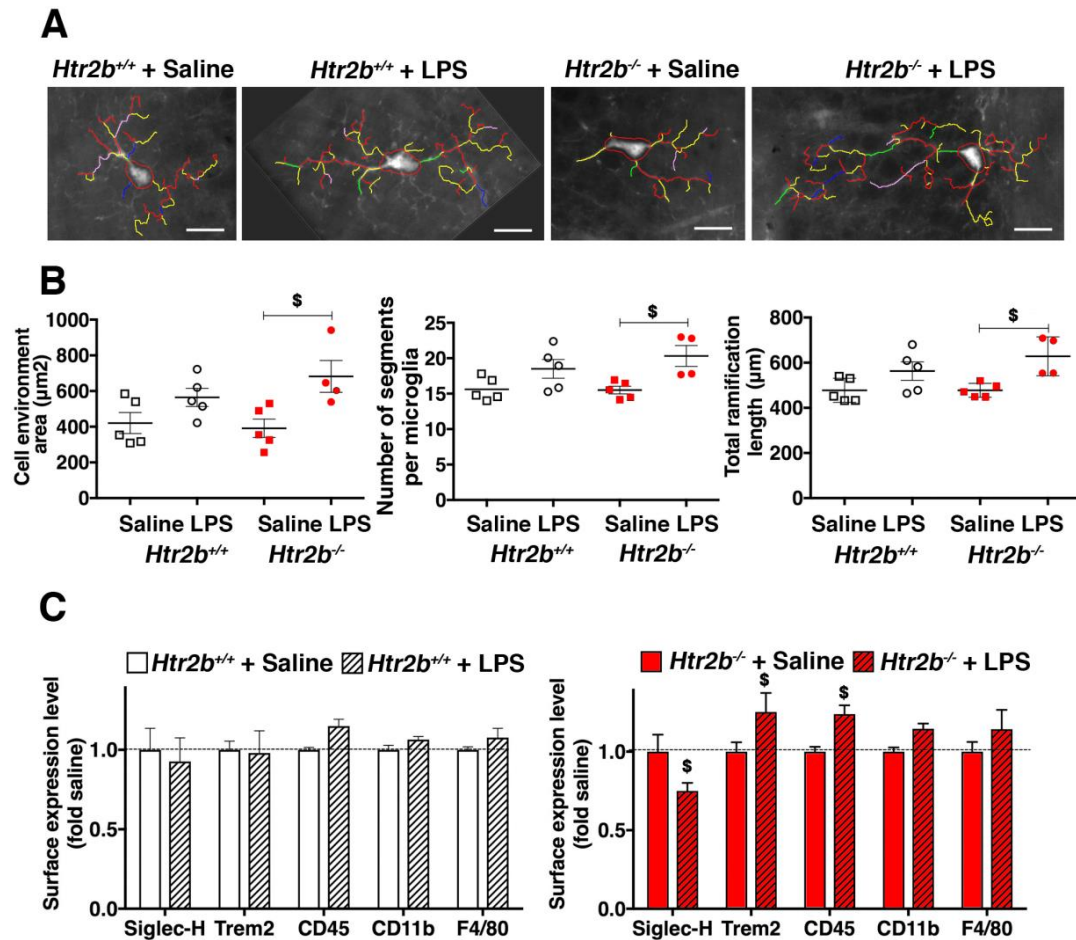


Figure 2: Microglial changes induced by peripheral inflammation are exacerbated in the absence of *Htr2b*. (A) Examples of microglia in hippocampus of *Htr2b*^{+/+} or *Htr2b*^{-/-} adult male mice 24h after saline or LPS injection. Connected but distinct segments have different colors. Bars = 5 μm. (B) Microglia morphological parameters analysis. Several parameters were significantly altered by LPS in *Htr2b*^{-/-} but not in *Htr2b*^{+/+} mice: cell environment area (Kruskal-Wallis-test, significant effect of genotype and treatment, $F_{3,19} = 8.91$, $p = 0.030$ and Dunn's post-test, significant effect of LPS on *Htr2b*^{-/-} mice $^{\$}p = 0.030$), number of segments ($F_{3,19} = 8.99$, $p = 0.030$ and significant effect of LPS on *Htr2b*^{-/-} mice $^{\$}p = 0.046$), and total ramification length ($F_{3,19} = 9.56$, $p = 0.023$ and significant effect of LPS on *Htr2b*^{-/-} mice $^{\$}p = 0.028$) $n = 4-5$ mice per group. The value for each animal (each dot) is the median of 200 measures, in average. (C) Analysis by flow cytometry of microglial surface markers indicated an effect of LPS in *Htr2b*^{-/-} but not *Htr2b*^{+/+} mice for the following markers: Siglec-H $^{\$}p = 0.023$, Trem2 $^{\$}p = 0.022$, and CD45 $^{\$}p = 0.030$, saline vs. LPS (unpaired t-test; $n = 6$ mice for each conditions). Means \pm SEM.

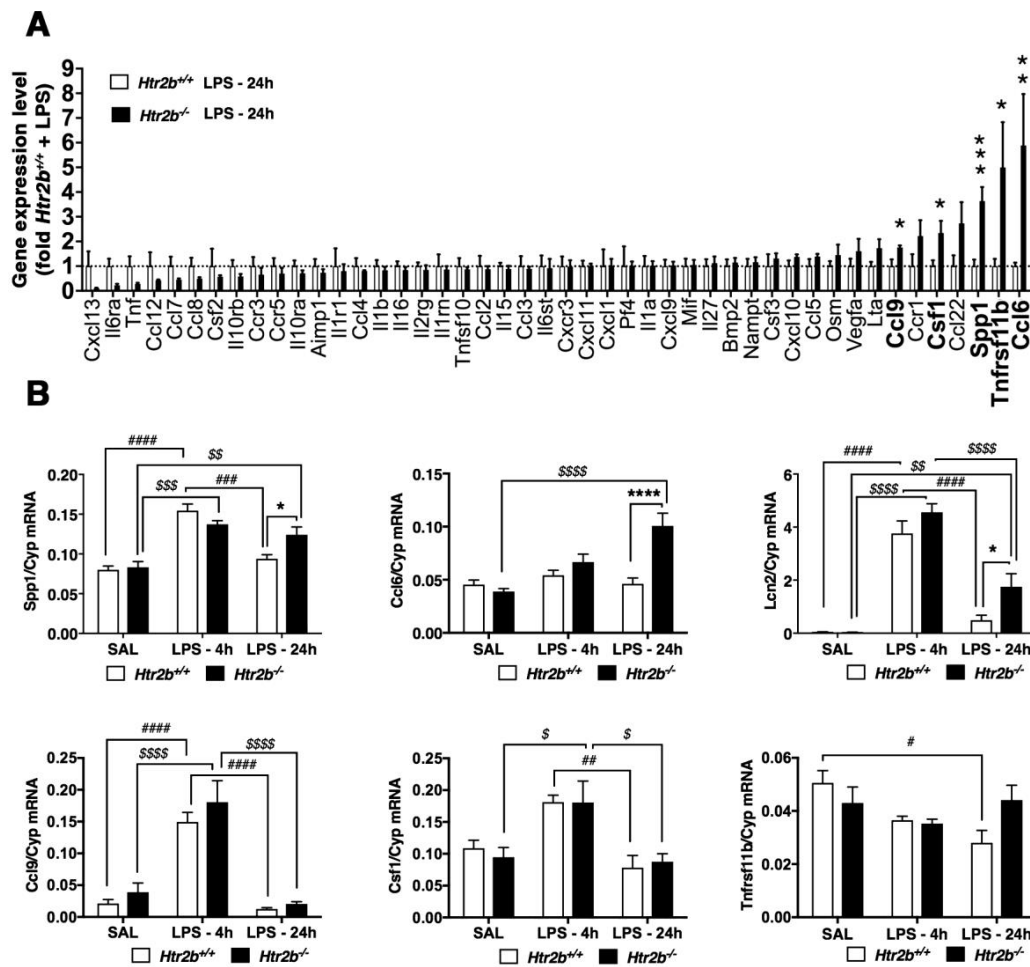


Figure 3: Stronger microglial activation and prolonged LPS-induced neuroinflammation in the absence of *Htr2b*. (A) Several inflammatory genes are overexpressed in LPS-treated microglial primary cultures from *Htr2b*^{-/-}, compared to *Htr2b*^{+/+}, pups. ***p*=0.013 *Ccl6*, **p*=0.013 *Tnfrsf11b*, ****p*=0.0004 *Spp1*, **p*=0.017 *Csf1*, **p*=0.030 *Ccl9*, multiple t test; *n*=4 independent cultures per genotype. (B) Gene expression in whole brain of adult male mice, 4 and 24h after a peripheral LPS injection, or in control (saline-SAL injection) conditions. Overall, significant difference between genotypes (indicated by *) were observed only at 24h after LPS injection, for *Spp1* mRNA (two-way ANOVA, interaction between genotype and treatment time $F_{2,43} = 4.12$, $p=0.023$; Bonferroni's post-hoc **p*=0.03), for *Ccl6* mRNA (interaction between genotype and treatment time $F_{2,47} = 10.81$, $p=0.0001$; Bonferroni's post-hoc *****p*<0.0001), and for *Lcn2* mRNA (interaction between genotype and treatment time $F_{2,49} = 3.52$, $p=0.037$; Bonferroni's post-hoc **p*=0.016). Other post-hoc comparisons revealing significant differences are shown ^s*p*<0.05, ^{ss}*p*<0.01, ^{sss}*p*<0.001, ^{ssss}*p*<0.0001 among *Htr2b*^{-/-} groups and [#]*p*<0.05, ^{##}*p*<0.01, ^{###}*p*<0.001, ^{####}*p*<0.0001 among *Htr2b*^{+/+} groups. *n*=9-11 mice per group. Means ± SEM.

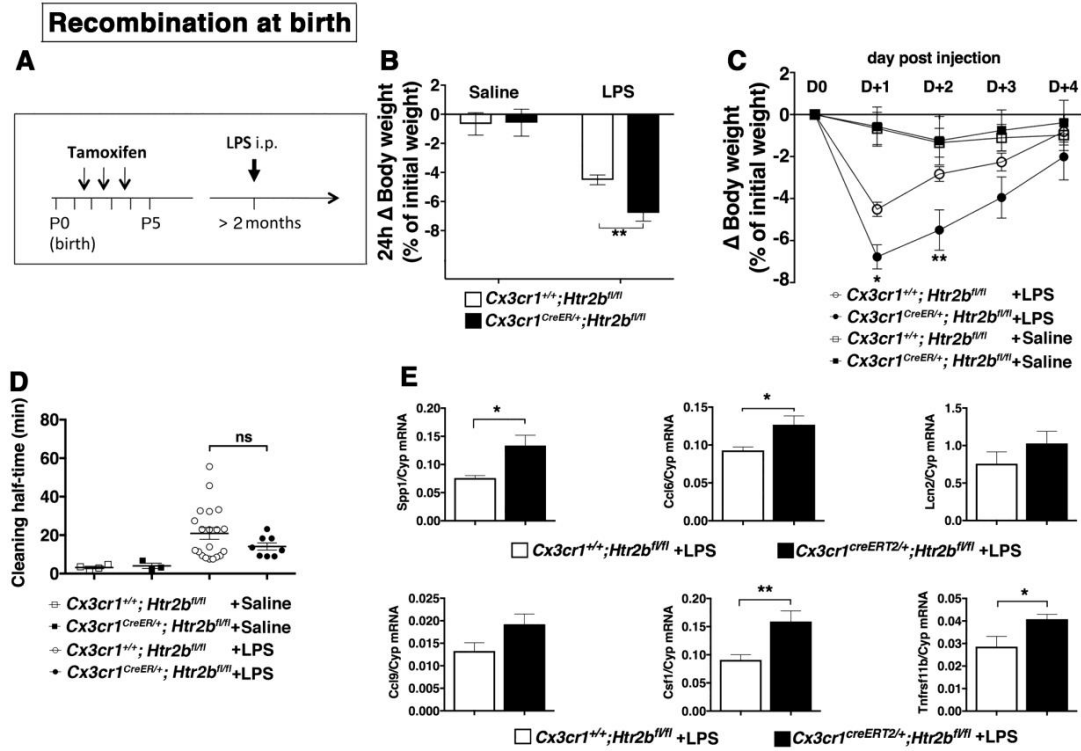


Figure 4: Lack of *Htr2b* selectively in microglia since birth is sufficient to enhance LPS-induced weight loss and neuroinflammation but not the grooming decrease. (A) Timeline of tamoxifen treatment for early *Htr2b* invalidation, and LPS injection. (B) A significant difference of weight loss is observed between genotypes at 24h after LPS injection. Two-way ANOVA showed a main effect of treatment ($F_{1,43} = 66.12, p < 0.0001$), post hoc Bonferroni's multiple comparison indicated a significant difference between LPS-treated groups: $*p = 0.0082$; $n = 7$ *Cx3cr1*^{+/+}; *Htr2b*^{fl/fl} + saline, 8 *Cx3cr1*^{CreERT2/+}; *Htr2b*^{fl/fl} + saline, 23 *Cx3cr1*^{+/+}; *Htr2b*^{fl/fl} +LPS, 9 *Cx3cr1*^{CreERT2/+}; *Htr2b*^{fl/fl} + LPS. (C) Weight recovery is delayed in mice invalidated for *Htr2b* since birth. Time-course of weight variation after LPS (circles) or saline (squares) injection in *Cx3cr1*^{+/+}; *Htr2b*^{fl/fl} (open symbols) and *Cx3cr1*^{CreERT2/+}; *Htr2b*^{fl/fl} (filled symbols) mice. Two-way ANOVA RM showed an interaction between genotype and time $F_{4,120} = 3.15, p = 0.017$. Post hoc Bonferroni's multiple comparison between LPS-treated groups indicated a stronger weight loss in *Cx3cr1*^{CreERT2/+}; *Htr2b*^{fl/fl} mice at D+1 and D+2 ($*p = 0.020$ and $**p = 0.004$, $n = 7$ *Cx3cr1*^{+/+}; *Htr2b*^{fl/fl} + saline, 8 *Cx3cr1*^{CreERT2/+}; *Htr2b*^{fl/fl} + saline, 23 *Cx3cr1*^{+/+}; *Htr2b*^{fl/fl} +LPS, and 9 *Cx3cr1*^{CreERT2/+}; *Htr2b*^{fl/fl} +LPS). (D) Cleaning half-time, an indirect measure of the grooming decrease after LPS, is similar in both genotypes. Two-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparison indicated no significant difference between *Cx3cr1*^{+/+}; *Htr2b*^{fl/fl} and *Cx3cr1*^{+/+}; *Htr2b*^{fl/fl} upon LPS. $n = 3, 4, 20, 8$ mice from left to right. (E) Expression level of neuroinflammatory markers in whole brain, 24h after LPS injection. mRNA for *Spp1*, *Ccl6*, *Csf1* and *Tnfrsf11b* are significantly elevated in the absence of *Htr2b* in microglia (unpaired t-test with Welch's correction, $*p = 0.016$, $*p = 0.027$, $**p = 0.009$, $*p = 0.036$, respectively, $n = 6-8$ mice per group). Means \pm SEM. Data pooled from three (D) or four (B, C) independent experiments. All mice were adult males.

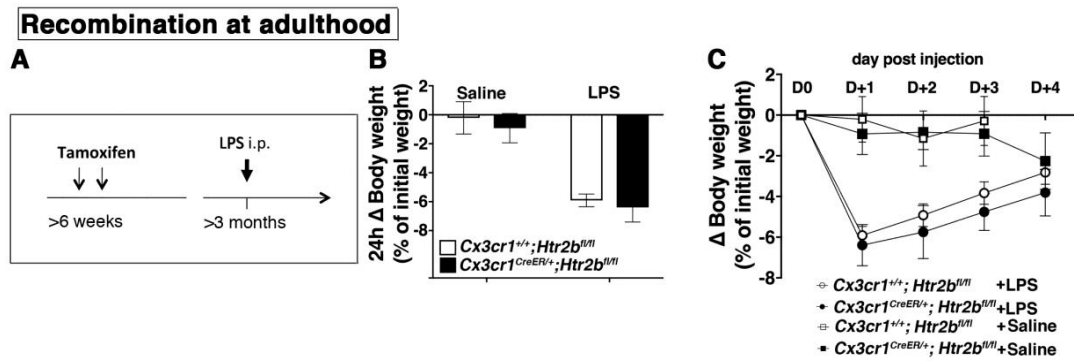


Figure 5: Invalidation of *Htr2b* in microglia at adulthood does not sensitize to the effects of LPS. (A) Timeline of tamoxifen treatment for *Htr2b* invalidation at adulthood, and LPS injection. (B) Weight loss upon LPS is similar in both genotypes at 24h after LPS injection. Two-way ANOVA showed no difference between genotypes after LPS injection. n=7 $Cx3cr1^{+/+}; Htr2b^{fl/fl}$ + saline, 5 $Cx3cr1^{CreERT2/+}; Htr2b^{fl/fl}$ + saline, 15 $Cx3cr1^{+/+}; Htr2b^{fl/fl}$ +LPS, and 8 $Cx3cr1^{CreERT2/+}; Htr2b^{fl/fl}$ +LPS). (C) Time-course of weight variation after LPS (circles) or saline (squares) injection in $Cx3cr1^{+/+}; Htr2b^{fl/fl}$ (open symbols) and $Cx3cr1^{CreERT2/+}; Htr2b^{fl/fl}$ (filled symbols) adult male mice. Two-way ANOVA RM showed no difference between genotypes after LPS injection. n=7 $Cx3cr1^{+/+}; Htr2b^{fl/fl}$ + saline, 5 $Cx3cr1^{CreERT2/+}; Htr2b^{fl/fl}$ + saline, 15 $Cx3cr1^{+/+}; Htr2b^{fl/fl}$ +LPS, and 8 $Cx3cr1^{CreERT2/+}; Htr2b^{fl/fl}$ +LPS. Means \pm SEM. Data pooled from three independent experiments. All mice were adult males.

Béchade et al.

Supplementary methods

Animals in the Supplementary figures S1 and S2.

In Figure S1, adult females were 3-10 months old. In Figure S2, aged males and females were 12-18 months old. For the other Supplementary figures, animals have been described in the main text.

Splash test to induce grooming in aged animals

The experiment was performed as for adult animals, except that in aged animals, as even basal grooming is reduced, fur state was scored over days instead of hours following the splash.

Microglia purification

To purify microglial and non-microglial fractions from whole brain (for Figure S5), a cell suspension was prepared as described for flow cytometry experiments in Methods. Then, cells were labeled with an anti-CD11b antibody coupled to magnetic beads (Miltenyi Biotec). Purification of microglia (CD11b-labeled cells) was performed by magnetic separation according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). The non-microglial fraction corresponds to the non-labeled cells, which flowed in the flow-through. Purity (92-98%) of the fractions was systematically controlled by flow cytometry (MACSQuant VYB, Miltenyi).

Supplementary Figures:

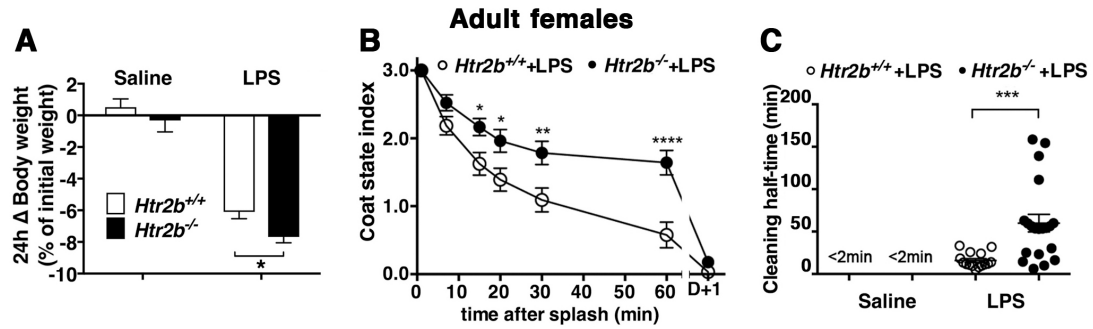


Figure S1: Sickness syndrome induced by peripheral inflammation is exacerbated in the absence of *Htr2b* in adult female mice. (A) Weight variation at 24h after saline or LPS injection. LPS-induced weight loss was stronger in *Htr2b*^{-/-} than in *Htr2b*^{+/+} female mice. Two-way ANOVA showed interaction between genotype and treatment ($F_{1,58} = 0.348$, $p=0.056$), post hoc Bonferroni's multiple comparison indicated a significant difference between both LPS-treated groups, $*p=0.039$ ($n=5$ *Htr2b*^{+/+}+Saline, 15 *Htr2b*^{-/-} +Saline, 16 *Htr2b*^{+/+}+LPS and 26 *Htr2b*^{-/-} +LPS). (B) Grooming behavior was more affected in *Htr2b*^{-/-} compared to *Htr2b*^{+/+} LPS-injected female mice. Two-way ANOVA-RM indicated a significant interaction between genotype and treatment ($F_{6,210} = 7.25$, $p<0.0001$), Bonferroni's post-hoc test indicated a significant difference between genotypes $*p=0.045$, $*p=0.028$, $**p=0.004$, $****p<0.0001$ at $t=15$, 20, 30 and 60 min post-splash ($n=16$ *Htr2b*^{+/+} and 22 *Htr2b*^{-/-}). (C) "Cleaning half-time" is increased after LPS injection in *Htr2b*^{-/-} compared to *Htr2b*^{+/+} female mice. Two-way ANOVA indicated a main effect of treatment ($F_{1,25} =$, $p=$), Bonferroni's post-hoc indicated a significant difference between *Htr2b*^{+/+}+LPS and *Htr2b*^{-/-}+LPS: $***p=0.0010$ ($n=7$ *Htr2b*^{+/+}+saline, 7 *Htr2b*^{-/-}+saline, 15 *Htr2b*^{+/+}+LPS, 20 *Htr2b*^{-/-}+LPS). A, B, C: Data pooled from 3 independent experiments. Means \pm SEM.

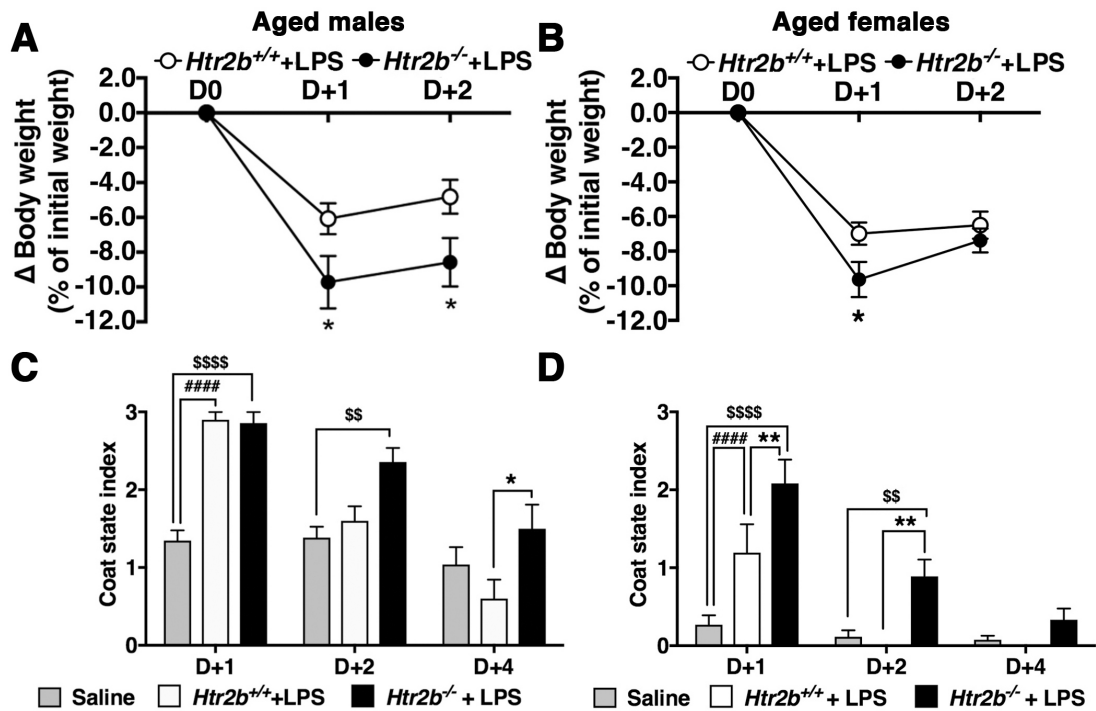


Figure S2: Sickness syndrome induced by peripheral inflammation is exacerbated in the absence of *Htr2b* in aged male and female mice. (A-B) Weight loss after LPS injection was stronger in *Htr2b*^{-/-} than in *Htr2b*^{+/+} aged mice, both males and females. (A) In aged male mice, two-way ANOVA-RM indicated a significant interaction between genotype and treatment ($F_{2,40} = 4.27, p=0.021$), Bonferroni's post-hoc test indicated a significant difference between genotypes * $p=0.029$, * $p=0.024$ at $t=24\text{h}$ (D+1), and 48h (D+2) post LPS-injection ($n=10$ *Htr2b*^{+/+} and 12 *Htr2b*^{-/-}). (B) In aged female mice, two-way ANOVA-RM indicated a significant interaction between genotype and treatment ($F_{2,40} = 3.36, p=0.045$), Bonferroni's post-hoc test indicated a significant difference between genotypes * $p=0.017$ at $t=24\text{h}$ (D+1) post LPS-injection ($n=11$ *Htr2b*^{+/+} and 11 *Htr2b*^{-/-}). (C-D) Fur cleaning by grooming after sucrose splash was delayed in aged *Htr2b*^{-/-} compared to *Htr2b*^{+/+} in both male and female LPS-injected mice. (C) In aged males, two-way ANOVA-RM indicated a significant interaction between genotype and treatment ($F_{4,44} = 9.71, p<0.0001$) and Bonferroni's post-hoc test indicated a significant difference between genotypes * $p=0.028$, at D+4 post-splash. Data from saline-treated mice of both genotypes were similar and pooled together. ($n=12$ saline, 5 *Htr2b*^{+/+}+LPS and 7 *Htr2b*^{-/-}+LPS). (D) In aged females, two-way ANOVA-RM indicated a significant interaction between genotype and treatment ($F_{4,56} = 12.06, p<0.0001$), and Bonferroni's post-hoc test indicated a significant difference between genotypes ** $p=0.0025$, ** $p=0.0025$ at D+1 and D+2 min post-splash. Data from saline-treated mice of both genotypes were similar and pooled together ($n=13$ saline, 9 *Htr2b*^{+/+}+LPS and 9 *Htr2b*^{-/-}+LPS). A-D: Data were collected from two to four independent experiments. Other post-hoc comparisons revealing significant differences are shown $^{ss}p<0.01$, $^{ssss}p<0.0001$ between *Htr2b*^{-/-} saline vs LPS and $^{####}p<0.0001$ between *Htr2b*^{+/+} saline vs LPS. Means \pm SEM.

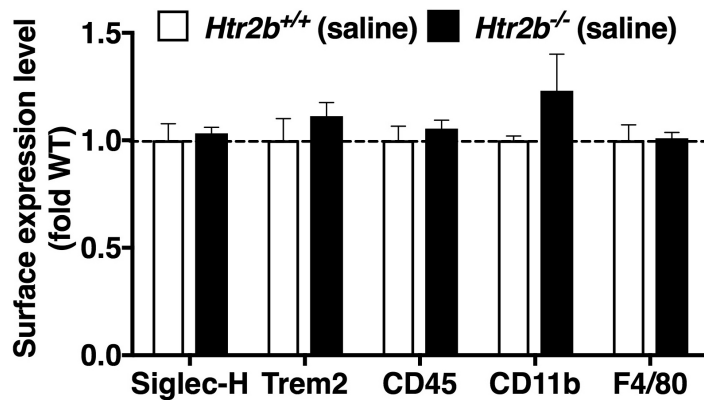


Figure S3: Basal expression of surface microglial markers is not modified in the absence of *Htr2b*. Analysis by flow cytometry of microglial markers in control condition (24h after a saline injection) didn't indicate difference in *Htr2b*^{-/-} compared to *Htr2b*^{+/+} mice (unpaired t-test; n=6 mice for each conditions). Means \pm SEM.

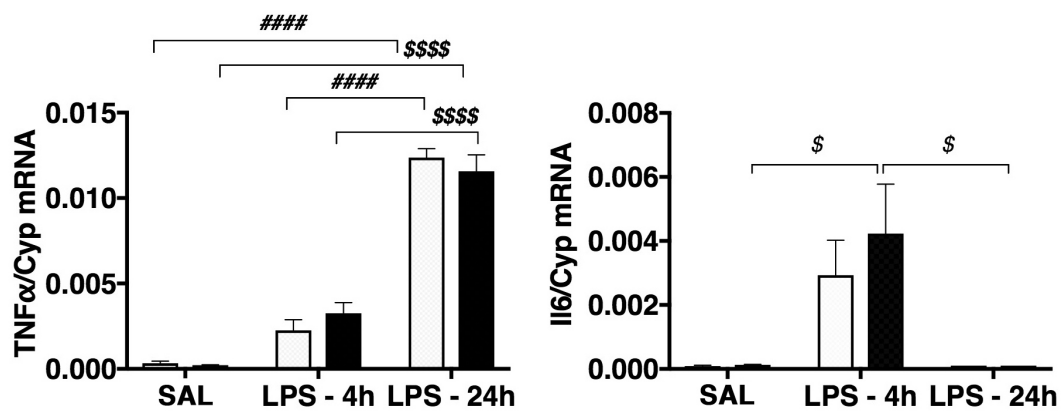


Figure S4: Classical markers of LPS-induced neuroinflammation are not modified by the absence of *Htr2b*. Gene expression was evaluated by RT-qPCR in mRNA from whole brain, 4h and 24h after peripheral LPS injection, or from control (saline) condition. No significant difference between genotypes was observed in the brain 24h after LPS injection for TNF α mRNA, (two-way ANOVA no interaction between genotype and treatment time $F_{2,31} = 0.527$, $p = 0.595$; n=4-11 mice), nor for IL6 mRNA (no interaction between genotype and treatment time $F_{2,17} = 0.426$, $p = 0.66$; n= 3-4 mice). Other post-hoc comparisons revealing significant differences are shown $^{\$}p < 0.05$, $^{\$ \$ \$}p < 0.0001$ between *Htr2b*^{-/-} time or treatment and $^{\# \# \# \#}p < 0.0001$ between *Htr2b*^{+/+} time or treatment. Means \pm SEM.

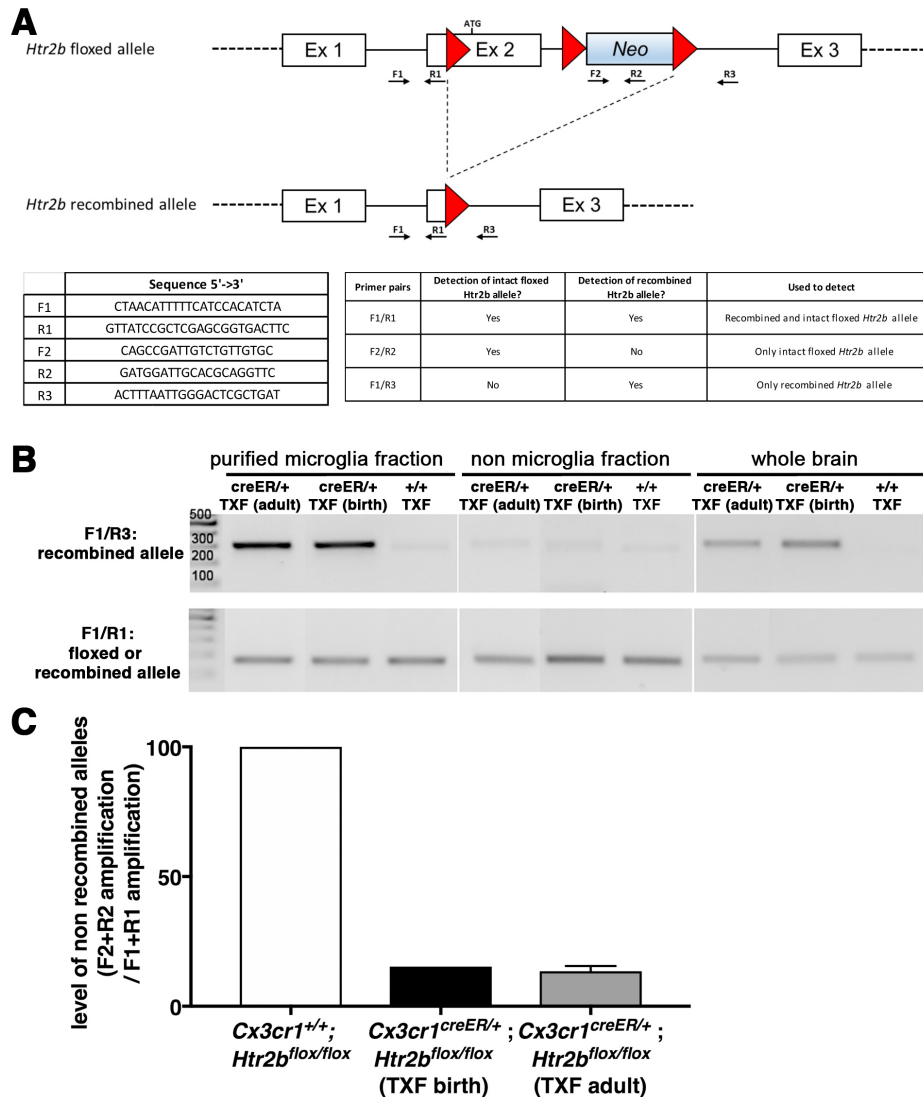


Figure S5: Recombination in *Cx3cr1*^{CreERT2/+}; *Htr2b*^{fl/fl} mice. (A) Top: Schematic of the *Htr2b* locus in *Htr2b*^{fl/fl} mice, before and after recombination, and position of the primers used. Bottom: sequences of the primers and combination used. (B) PCR to assess the specificity of recombination in microglia. Microglia and non-microglial fractions were purified by magnetic cell sorting (See Supplementary Methods) from adult *Cx3cr1*^{+/+}; *Htr2b*^{fl/fl} and *Cx3cr1*^{CreERT2/+}; *Htr2b*^{fl/fl} mice, all treated with tamoxifen at birth or at adulthood. Cells were lysed and PCR were performed to detect recombined (F1+R3 pair of primers) and intact (F1+R1 pair) loci. Only microglia bear the recombined allele, assessing the cell-specificity of the recombination, and no recombination was found in *Cx3cr1*^{+/+}; *Htr2b*^{fl/fl}, assessing the Cre-dependence of the recombination. (C) Quantitative PCR was performed on the DNA of microglia fractions, to assess the efficiency of recombination. To this aim, we used a primer pair that amplifies only the non-recombined locus (F2+R2), and F1+R1 pair for the internal reference. The level of *Htr2b* recombination in the microglia fraction of animals was determined with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method using, for normalization, the level of the non-recombined allele in *Cx3cr1*^{+/+}; *Htr2b*^{fl/fl} mice which by nature (and as checked in B) cannot recombine. Similar decreases were observed in *Cx3cr1*^{CreERT2/+}; *Htr2b*^{fl/fl} mice treated with tamoxifen at birth or at adulthood.

Table S1**Antibodies used for cytometry**

Antibody or antigen	clone	label	company	reference
Fc block : TruStain fcX	93	none	Biolegend	101320
CD11b	M1/70	FITC, PE-Cy5	Biolegend	101206,101209
CD11b	M1/70	PE	AbD Serotec	MCA74PE
Trem2	237920	PE	R&D Systems	FAB17291P
SiglecH	551	PE	Biolegend	129605
CD45	30-F11	PE-Cy7, PE-Cy5	Biolegend	103114, 103109
F4/80	Cl:A3-1	PE	AbD Serotec	MCA497PE

Table S2**Primers used for RT-qPCR**

Gene	Forward	Reverse	Fragment size
<i>Spp1</i>	TGGCAGCTCAGAGGAGAAG	TTCTGTGGCGCAAGGAGATT	101
<i>Ccl6</i>	CTTGTGGCTGTCCTTGGGTC	TACATGGGATCTGTGGGCA	145
<i>Lipocalin 2</i>	ACAACCAGTTCGCCATGGTAT	AGCTCCTTGGTTCTTCCATACA	88
<i>Ccl9</i>	ACCAGTGGTGGGTGTACCA	TTGTAGGTCCGTGGTTGTGA	137
<i>Csf1</i>	CACTGCTAGGGGTGGCTT	CACTGCATAGGGGTGGCTT	69
<i>Tnfrs11b</i>	AGAAGCCACGAAAAGTGTG	TCACTTTGGTCCCAGGCAA	131
<i>Tnfa</i>	GAAGTGGCAGAAGAGGCACT	AGGGTCTGGGCCATAGAACT	203
<i>Il6</i>	CCGGAGAGGAGACTTCACAG	CAGAATTGCCATTGCACAAC	133
<i>Cyclophilin</i>	CCATCGTGTCATCAAGGACTT	TTGCCATCCAGCCAGGAGGTC	216

BIBLIOGRAPHIE

- Abbracchio, M.P., and Ceruti, S. (2007). P1 receptors and cytokine secretion. *Purinergic Signal*. 3, 13–25.
- Agnati, L.F., Zoli, M., Strömberg, I., and Fuxe, K. (1995). Intercellular communication in the brain: Wiring versus volume transmission. *Neuroscience* 69, 711–726.
- Albizu, L., Holloway, T., González-Maeso, J., and Sealfon, S.C. (2011). Functional crosstalk and heteromerization of serotonin 5-HT_{2A} and dopamine D₂ receptors. *Neuropharmacology* 61, 770–777.
- Alliot, F., Godin, I., and Pessac, B. (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Dev. Brain Res.* 117, 145–152.
- Amin, A.H., Crawford, T.B.B., and Gaddum, J.H. (1954). The distribution of substance P and 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the dog. *J. Physiol.* 126, 596–618.
- Avignone, E., Ulmann, L., Levavasseur, F., Rassendren, F., and Audinat, E. (2008). Status epilepticus induces a particular microglial activation state characterized by enhanced purinergic signaling. *J. Neurosci.* 28, 9133–9144.
- Avignone, E., Lepleux, M., Angibaud, J., and Nägerl, U.V. (2015). Altered morphological dynamics of activated microglia after induction of status epilepticus. *J. Neuroinflammation* 12.
- Banas, S.M., Doly, S., Boutourlinsky, K., Diaz, S.L., Belmer, A., Callebert, J., Collet, C., Launay, J.M., and Maroteaux, L. (2011). Deconstructing antiobesity compound action: Requirement of serotonin 5-HT_{2B} receptors for dexfenfluramine anorectic effects. *Neuropsychopharmacology* 36, 423–433.
- Bang, J., Kim, H.Y., and Lee, H. (2016). Optogenetic and chemogenetic approaches for studying astrocytes and gliotransmitters. *Exp. Neurobiol.* 25, 205–221.
- Barclay, A.N., Wright, G.J., Brooke, G., and Brown, M.H. (2002). CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol.* 23, 285–290.
- Baxter, G.S., Murphy, O.E., and Blackburn, T.P. (1994). Further characterization of 5-hydroxytryptamine receptors (putative 5-HT_{2B}) in rat stomach fundus longitudinal muscle. *Br. J. Pharmacol.* 112, 323–331.
- Belarbi, K., and Rosi, S. (2013). Modulation of adult-born neurons in the inflamed hippocampus. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 1–8.
- Belmer, A., Quentin, E., Diaz, S.L., Guiard, B.P., Fernandez, S.P., Doly, S., Banas, S.M., Pitychoutis, P.M., Moutkine, I., Muzerelle, A., et al. (2018). Positive regulation of raphe serotonin neurons by serotonin 2B receptors. *Neuropsychopharmacology* 43, 1623–1632.
- Bennett, M.L., Bennett, F.C., Liddelow, S.A., Ajami, B., Zamanian, J.L., Fernhoff, N.B., Mulinyawe, S.B., Bohlen, C.J., Adil, A., Tucker, A., et al. (2016). New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E1738–E1746.
- Bernier, L.P., Bohlen, C.J., York, E.M., Choi, H.B., Kamyabi, A., Dissing-Olesen, L., Hefendehl, J.K., Collins, H.Y., Stevens, B., Barres, B.A., et al. (2019). Nanoscale Surveillance of the Brain by Microglia via cAMP-Regulated Filopodia. *Cell Rep.* 27, 2895–2908.e4.
- Bevilacqua, L., Doly, S., Kaprio, J., Yuan, Q., Tikkanen, R., Paunio, T., Zhou, Z., Wedenoja, J., Maroteaux, L., Diaz, S., et al. (2010). A population-specific HTR_{2B} stop codon predisposes to severe impulsivity. *Nature* 468, 1061–1068.

- De Biase, L.M., and Bonci, A. (2019). Region-Specific Phenotypes of Microglia: The Role of Local Regulatory Cues. *Neuroscientist* 25, 314–333.
- De Biase, L.M., Schuebel, K.E., Fusfeld, Z.H., Jair, K., Hawes, I.A., Cimbri, R., Zhang, H.-Y., Liu, Q.-R., Shen, H., Xi, Z.-X., et al. (2017). Local Cues Establish and Maintain Region-Specific Phenotypes of Basal Ganglia Microglia. *Neuron* 95, 341–356.e6.
- Biber, K., Neumann, H., Inoue, K., and Boddeke, H.W.G.M. (2007). Neuronal “On” and “Off” signals control microglia. *Trends Neurosci.* 30, 596–602.
- Bockaert, J., Claeysen, S., Bécamel, C., Dumuis, A., and Marin, P. (2006). Neuronal 5-HT metabotropic receptors: Fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. *Cell Tissue Res.* 326, 553–572.
- Bohlen, C.J., Bennett, F.C., Tucker, A.F., Collins, H.Y., Mulinyawe, S.B., and Barres, B.A. (2017). Diverse Requirements for Microglial Survival, Specification, and Function Revealed by Defined-Medium Cultures. *Neuron* 94, 759–773.e8.
- Bonaventure, P., Guo, H., Tian, B., Liu, X., Bittner, A., Roland, B., Salunga, R., Ma, X.J., Kamme, F., Meurers, B., et al. (2002). Nuclei and subnuclei gene expression profiling in mammalian brain. *Brain Res.* 943, 38–47.
- Bonhaus, D.W., Bach, C., DeSouza, A., Salazar, F.H.R., Matsuoka, B.D., Zuppan, P., Chan, H.W., and Eglen, R.M. (1995). The pharmacology and distribution of human 5-hydroxytryptamine_{2B} (5-HT_{2b}) receptor gene products: comparison with 5-HT_{2a} and 5-HT_{2c} receptors. *Br. J. Pharmacol.* 115, 622–628.
- Borroto-Escuela, D.O., Carlsson, J., Ambrogini, P., Narváez, M., Wydra, K., Tarakanov, A.O., Li, X., Millón, C., Ferraro, L., Cuppini, R., et al. (2017). Understanding the role of gpcr heteroreceptor complexes in modulating the brain networks in health and disease. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 1–20.
- Bouvier, M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 274–286.
- Braun, N., Sévigny, J., Robson, S.C., Enjyoji, K., Guckelberger, O., Hammer, K., Di Virgilio, F., and Zimmermann, H. (2000). Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain. *Eur. J. Neurosci.* 12, 4357–4366.
- Bunin, M.A., and Wightman, R.M. (1998). Quantitative evaluation of 5-hydroxytryptamine (serotonin) neuronal release and uptake: An investigation of extrasynaptic transmission. *J. Neurosci.* 18, 4854–4860.
- Butovsky, O., Jedrychowski, M.P., Moore, C.S., Cialic, R., Lanser, A.J., Gabriely, G., Koeglsperger, T., Dake, B., Wu, P.M., Doykan, C.E., et al. (2014). Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat. Neurosci.* 17, 131–143.
- Cardona, A.E., Piro, E.P., Sasse, M.E., Kostenko, V., Cardona, S.M., Dijkstra, I.M., Huang, D.R., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R., et al. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat. Neurosci.* 9, 917–924.
- Chhor, V., Le Charpentier, T., Lebon, S., Oré, M.V., Celador, I.L., Josserand, J., Degos, V., Jacotot, E., Hagberg, H., Sävman, K., et al. (2013). Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia In vitro. *Brain. Behav. Immun.* 32, 70–85.

- Choi, D.S., and Maroteaux, L. (1996). Immunohistochemical localisation of the serotonin 5-HT_{2B} receptor in mouse gut, cardiovascular system, and brain. *FEBS Lett.* *391*, 45–51.
- Choi, D.S., Colas, J.F., Kellermann, O., Loric, S., Launay, J.M., Rosay, P., and Maroteaux, L. (1994). The mouse 5-HT_{2B} receptor: possible involvement in trophic functions of serotonin. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand)*. *40*, 403–411.
- Choi, H.B., Ryu, J.K., Kim, S.U., and McLarnon, J.G. (2007). Modulation of the purinergic P2X₇ receptor attenuates lipopolysaccharide-mediated microglial activation and neuronal damage in inflamed brain. *J. Neurosci.* *27*, 4957–4968.
- Christiane-Nolte, Kirchhoff, F., and Kettenmann, H. (1997). Epidermal growth factor is a motility factor for microglial cells in vitro: Evidence for EGF receptor expression. *Eur. J. Neurosci.* *9*, 1690–1698.
- Colas, J.F., Choi, D.S., Launay, J.M., and Maroteaux, L. (1997). Evolutionary conservation of the 5-HT(2B) receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *812*, 149–153.
- Conn, P.J., and Sanders-Bush, E. (1984). Selective 5ht-2 antagonists inhibit serotonin stimulated phosphatidylinositol metabolism in cerebral cortex. *Neuropharmacology* *23*, 993–996.
- Cordes, S.P. (2005). Molecular genetics of the early development of hindbrain serotonergic neurons. *Clin. Genet.* *68*, 487–494.
- Cox, D.A., and Cohen, M.L. (1995). 5-HT_{2B} receptor signaling in the rat stomach fundus: dependence on calcium influx, calcium release and protein kinase C. *Behav. Brain Res.* *73*, 289–292.
- Cuadros, M.A., and Navascués, J. (2001). Early origin and colonization of the developing central nervous system by microglial precursors. *Pgress in Brain Rrwxch* *132*.
- Cussac, D., Raully-Lestienne, I., Heusler, P., Finana, F., Cathala, C., Bernois, S., and De Vries, L. (2012). μ -opioid and 5-HT_{1A} receptors heterodimerize and show signalling crosstalk via G protein and MAP-kinase pathways. *Cell. Signal.* *24*, 1648–1657.
- Czeh, M., Gressens, P., and Kaindl, A.M. (2011). The yin and yang of microglia. *Dev. Neurosci.* *33*, 199–209.
- Dahlström, A., and Fuxe, K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* *20*, 398–399.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V, Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Gan, W.B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* *8*, 752–758.
- Diaz, S.L., Doly, S., Narboux-Nme, N., Fernández, S., Mazot, P., Banas, S.M., Boutourlinsky, K., Moutkine, I., Belmer, A., Roumier, A., et al. (2012). 5-HT_{2B} receptors are required for serotonin-selective antidepressant actions. *Mol. Psychiatry* *17*, 154–163.
- Dissing-Olesen, L., LeDue, J.M., Rungta, R.L., Hefendehl, J.K., Choi, H.B., and MacVicar, B.A. (2014). Activation of neuronal NMDA receptors triggers transient ATP-mediated microglial process outgrowth. *J. Neurosci.* *34*, 10511–10527.
- Doly, S., Valjent, E., Setola, V., Callebert, J., Hervé, D., Launay, J.M., and Maroteaux, L. (2008). Serotonin 5-HT_{2B} receptors are required for 3,4- methylenedioxymethamphetamine-induced hyperlocomotion and 5-HT release in vivo and in vitro. *J. Neurosci.* *28*, 2933–2940.

- Doly, S., Quentin, E., Eddine, R., Tolu, S., Fernandez, S.P., Bertran-Gonzalez, J., Valjent, E., Belmer, A., Viñals, X., Callebert, J., et al. (2017). Serotonin 2B receptors in mesoaccumbens dopamine pathway regulate cocaine responses. *J. Neurosci.* *37*, 10372–10388.
- Dransfield, I., Zagórska, A., Lew, E.D., Michail, K., and Lemke, G. (2015). Mer receptor tyrosine kinase mediates both tethering and phagocytosis of apoptotic cells. *Cell Death Dis.* *6*.
- Dumitrescu, R., Kulcke, C., Königshoff, M., Kouri, F., Yang, X., Morrell, N., Ghofrani, H.A., Weissmann, N., Reiter, R., Seeger, W., et al. (2011). Terguride ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Eur. Respir. J.* *37*, 1104–1118.
- Etienne, F., Mastrolia, V., Maroteaux, L., Girault, J.-A., Gervasi, N., and Roumier, A. (2019). Two-photon imaging of microglial processes' attraction toward ATP or serotonin in acute brain slices. *J. Vis. Exp.* *2019*.
- Färber, K., Pannasch, U., and Kettenmann, H. (2005). Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells. *Mol. Cell. Neurosci.* *29*, 128–138.
- Färber, K., Markworth, S., Pannasch, U., Nolte, C., Prinz, V., Kronenberg, G., Gertz, K., Endres, M., Bechmann, I., Enjyoji, K., et al. (2008). The ectonucleotidase cd39/ENTPDase1 modulates purinergic-mediated microglial migration. *Glia* *56*, 331–341.
- Fitzgerald, L.W., Burn, T.C., Brown, B.S., Patterson, J.P., Corjay, M.H., Valentine, P.A., Sun, J.H., Link, J.R., Abbaszade, I., Hollis, J.M., et al. (2000). Possible role of valvular serotonin 5-HT(2B) receptors in the cardiopathy associated with fenfluramine. *Mol. Pharmacol.* *57*, 75–81.
- Fourgeaud, L., Traves, P.G., Tufail, Y., Leal-Bailey, H., Lew, E.D., Burrola, P.G., Callaway, P., Zagorska, A., Rothlin, C. V., Nimmerjahn, A., et al. (2016). TAM receptors regulate multiple features of microglial physiology. *Nature* *532*, 240–244.
- Fribourg, M., Moreno, J.L., Holloway, T., Provasi, D., Baki, L., Mahajan, R., Park, G., Adney, S.K., Hatcher, C., Eltit, J.M., et al. (2011). Decoding the signaling of a GPCR heteromeric complex reveals a unifying mechanism of action of antipsychotic drugs. *Cell* *147*, 1011–1023.
- Fu, R., Shen, Q., Xu, P., Luo, J.J., and Tang, Y. (2014). Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases. *Mol. Neurobiol.* *49*, 1422–1434.
- Gaitonde, S.A., and Gonzá Lez-Maeso, J. (2017). Contribution of heteromerization to G protein-coupled receptor function. *Curr. Opin. Pharmacol.* *32*, 23–31.
- Garfield, A.S., and Heisler, L.K. (2009). Pharmacological targeting of the serotonergic system for the treatment of obesity. In *Journal of Physiology*, (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 49–60.
- Gaspar, P., Cases, O., and Maroteaux, L. (2003). The developmental role of serotonin: News from mouse molecular genetics. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 1002–1012.
- Gierten, J., Ficker, E., Bloehs, R., Schlömer, K., Kathöfer, S., Scholz, E., Zitron, E., Kiesecker, C., Bauer, A., Becker, R., et al. (2008). Regulation of two-pore-domain (K 2P) potassium leak channels by the tyrosine kinase inhibitor genistein. *Br. J. Pharmacol.* *154*, 1680–1690.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* (80-.). *330*, 841–845.
- Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., and Huber, T. (2013). Origin and differentiation of microglia. *Front. Cell. Neurosci.*

- Gong, Q.J., Li, Y.Y., Xin, W.J., Zhang, Y., Ren, W.J., Wei, X.H., Li, Y.Y., Zhang, T., and Liu, X.G. (2009). ATP induces long-term potentiation of C-fiber-evoked field potentials in spinal dorsal horn: The roles of P2X4 receptors and p38 MAPK in microglia. *Glia* 57, 583–591.
- González-Maeso, J., Ang, R.L., Yuen, T., Chan, P., Weisstaub, N. V., López-Giménez, J.F., Zhou, M., Okawa, Y., Callado, L.F., Milligan, G., et al. (2008). Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature* 452, 93–97.
- Gould, E., Gibbs, R., Moorjani, B., and Luine, V. (1994). The effects of adrenal steroids and excitatory input on neuronal birth and survival. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 743, 73–93.
- Grabert, K., Michoel, T., Karavolos, M.H., Clohisey, S., Kenneth Baillie, J., Stevens, M.P., Freeman, T.C., Summers, K.M., and McColl, B.W. (2016). Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat. Neurosci.* 19, 504–516.
- Grace, P.M., Strand, K.A., Galer, E.L., Urban, D.J., Wang, X., Baratta, M. V., Fabisiak, T.J., Anderson, N.D., Cheng, K., Greene, L.I., et al. (2016). Morphine paradoxically prolongs neuropathic pain in rats by amplifying spinal NLRP3 inflammasome activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E3441–E3450.
- Grace, P.M., Wang, X., Strand, K.A., Baratta, M. V, Zhang, Y., Galer, E.L., Yin, H., Maier, S.F., and Watkins, L.R. (2018). DREADDED microglia in pain: Implications for spinal inflammatory signaling in male rats. *Exp. Neurol.* 304, 125–131.
- Gyoneva, S., and Traynelis, S.F. (2013). Norepinephrine modulates the motility of resting and activated microglia via different adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* 288, 15291–15302.
- de Haas, A.H., Boddeke, H.W.G.M., and Biber, K. (2008). Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS. *Glia* 56, 888–894.
- Hanisch, U.K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10, 1387–1394.
- Haskó, G., Pacher, P., Vizi, E.S., and Illes, P. (2005). Adenosine receptor signaling in the brain immune system. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 511–516.
- Haynes, S.E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M.E., Gan, W.B., and Julius, D. (2006). The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat. Neurosci.* 9, 1512–1519.
- He, Y., Taylor, N., Fourgeaud, L., and Bhattacharya, A. (2017). The role of microglial P2X7: Modulation of cell death and cytokine release. *J. Neuroinflammation* 14.
- Hertz, L., Lovatt, D., Goldman, S.A., and Nedergaard, M. (2010). Adrenoceptors in brain: Cellular gene expression and effects on astrocytic metabolism and [Ca²⁺]_i. *Neurochem. Int.* 57, 411–420.
- Hirayama, M., and Kuriyama, M. (2001). MK-801 is cytotoxic to microglia in vitro and its cytotoxicity is attenuated by glutamate, other excitotoxic agents and atropine: Possible presence of glutamate receptor and muscarinic receptor on microglia. *Brain Res.* 897, 204–206.
- Hong, S., Beja-Glasser, V.F., Nfonoyim, B.M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K.M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B.A., et al. (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* (80-.). 352, 712–716.
- Horton, Y.M., Lubbert, H., and Houslay, M.D. (1996). Localization of the gene for the human serotonin 5-HT_{2B} receptor to chromosome 2. *Mol. Membr. Biol.* 13, 29–31.

- Howe, A.K. (2004). Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1692, 159–174.
- Hu, X., Zhou, H., Zhang, D., Yang, S., Qian, L., Wu, H.M., Chen, P.S., Wilson, B., Gao, H.M., Lu, R.B., et al. (2012). Clozapine protects dopaminergic neurons from inflammation-induced damage by inhibiting microglial overactivation. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 7, 187–201.
- Huck, J.H., Freyer, D., Böttcher, C., Mladinov, M., Muselmann-Genschow, C., Thielke, M., Gladow, N., Bloomquist, D., Mergenthaler, P., and Priller, J. (2015). De novo expression of dopamine D2 receptors on microglia after stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 1804–1811.
- Iida, T., Yoshikawa, T., Matsuzawa, T., Naganuma, F., Nakamura, T., Miura, Y., Mohsen, A.S., Harada, R., Iwata, R., and Yanai, K. (2015). Histamine H3 receptor in primary mouse microglia inhibits chemotaxis, phagocytosis, and cytokine secretion. *Glia* 63, 1213–1225.
- Inoue, K., Hosoi, J., and Denda, M. (2007). Extracellular ATP has stimulatory effects on the expression and release of IL-6 via purinergic receptors in normal human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 127, 362–371.
- Irino, Y., Nakamura, Y., Inoue, K., Kohsaka, S., and Ohsawa, K. (2008). Akt activation is involved in P2Y12 receptor-mediated chemotaxis of microglia. *J. Neurosci. Res.* 86, 1511–1519.
- Ishii, Y., Yamaizumi, A., Kawakami, A., Islam, A., Choudhury, M.E., Takahashi, H., Yano, H., and Tanaka, J. (2015). Anti-inflammatory effects of noradrenaline on LPS-treated microglial cells: Suppression of NF κ B nuclear translocation and subsequent STAT1 phosphorylation. *Neurochem. Int.* 90, 56–66.
- Izquierdo, P., Attwell, D., and Madry, C. (2019). Ion Channels and Receptors as Determinants of Microglial Function. *Trends Neurosci.* 42, 278–292.
- Jacobs, B.L., and Fornal, C.A. (1993). 5-HT and motor control: a hypothesis. *Trends Neurosci.* 16, 346–352.
- Jaffré, F., Bonnin, P., Callebert, J., Debbabi, H., Setola, V., Doly, S., Monassier, L., Mettauer, B., Blaxall, B.C., Launay, J.M., et al. (2009). Serotonin and angiotensin receptors in cardiac fibroblasts coregulate adrenergic-dependent cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 104, 113–123.
- Jensen, P., Farago, A.F., Awatramani, R.B., Scott, M.M., Deneris, E.S., and Dymecki, S.M. (2008). Redefining the serotonergic system by genetic lineage. *Nat. Neurosci.* 11, 417–419.
- Jinno, S., Fleischer, F., Eckel, S., Schmidt, V., and Kosaka, T. (2007). Spatial arrangement of microglia in the mouse hippocampus: A stereological study in comparison with astrocytes. *Glia* 55, 1334–1347.
- Joshi, R.S., Quadros, R., Drumm, M., Ain, R., and Panicker, M.M. (2017). Sedative effect of Clozapine is a function of 5-HT2A and environmental novelty. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 27, 70–81.
- Jurga, A.M., Piotrowska, A., Makuch, W., Przewlocka, B., and Mika, J. (2017). Blockade of P2X4 receptors inhibits neuropathic pain-related behavior by preventing MMP-9 activation and, consequently, pronociceptive interleukin release in a rat model. *Front. Pharmacol.* 8.
- Kalla, R., Bohatschek, M., Kloss, C.U.A., Krol, J., Von Maltzan, X., and Raivich, G. (2003). Loss of microglial ramification in microglia-astrocyte cocultures: Involvement of adenylate cyclase, calcium, phosphatase, and Gi-protein systems. *Glia* 41, 50–63.

- Kanner, B.I., and Schuldiner, S. (1987). Mechanism of transport and storage of neurotransmitter. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 22, 1–38.
- Kellermann, O., Loric, S., Maroteaux, L., and Launay, J.M. (1996). Sequential onset of three 5-HT receptors during the 5-hydroxytryptaminergic differentiation of the murine 1C11 cell line. *Br. J. Pharmacol.* 118, 1161–1170.
- Kennett, G.A., Bright, F., Trail, B., Baxter, G.S., and Blackburn, T.P. (1996). Effects of the 5-HT_{2B} receptor agonist, BW 723C86, on three rat models of anxiety. *Br. J. Pharmacol.* 117, 1443–1448.
- 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., et al. (2017). A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* 169, 1276-1290.e17.
- Kettenmann, H., Hanisch, U.K., Noda, M., and Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* 91, 461–553.
- Khlghatyan, J., and Beaulieu, J.-M. (2018). Are FXR Family Proteins Integrators of Dopamine Signaling and Glutamatergic Neurotransmission in Mental Illnesses? *Front. Synaptic Neurosci.* 10, 1–8.
- Kim, I., Mlsna, L.M., Yoon, S., Le, B., Yu, S., Xu, D., and Koh, S. (2015). A postnatal peak in microglial development in the mouse hippocampus is correlated with heightened sensitivity to seizure triggers. *Brain Behav.* 5, 1–4.
- Klein, H.C., Shoji, A., De Vries, E., Dierckx, R., and Doorduyn, J. (2014). EPA-1467 – Effects of treatment of schizophrenia on microglia: A [11C]PK11195 PET study. *Eur. Psychiatry* 29, 1.
- Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, B. V., Jacobson, K.A., Kohsaka, S., and Inoue, K. (2007). UDP acting at P2Y₆ receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 446, 1091–1095.
- Koizumi, S., Ohsawa, K., Inoue, K., and Kohsaka, S. (2013). Purinergic receptors in microglia: Functional modal shifts of microglia mediated by P2 and P1 receptors. *Glia* 61, 47–54.
- Kolodziejczak, M., Béchade, C., Gervasi, N., Irinopoulou, T., Banas, S.M., Cordier, C., Rebsam, A., Roumier, A., and Maroteaux, L. (2015). Serotonin Modulates Developmental Microglia via 5-HT_{2B} Receptors: Potential Implication during Synaptic Refinement of Retinogeniculate Projections. *ACS Chem. Neurosci.* 6, 1219–1230.
- Kong, Y., Ruan, L., Qian, L., Liu, X., and Le, Y. (2010). Norepinephrine promotes microglia to uptake and degrade amyloid β peptide through upregulation of mouse formyl peptide receptor 2 and induction of insulin-degrading enzyme. *J. Neurosci.* 30, 11848–11857.
- Krabbe, G., Matyash, V., Pannasch, U., Mamer, L., Boddeke, H.W.G.M., and Kettenmann, H. (2012). Activation of serotonin receptors promotes microglial injury-induced motility but attenuates phagocytic activity. *Brain. Behav. Immun.* 26, 419–428.
- Kurpius, D., Nolley, E.P., and Dailey, M.E. (2007). Purines induce directed migration and rapid homing of microglia to injured pyramidal neurons in developing hippocampus. *Glia* 55, 873–884.
- Kursar, J.D., Nelson, D.L., Wainscott, D.B., and Baez, M. (1994). Molecular cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the human 5-hydroxytryptamine(2B)

receptor. *Mol. Pharmacol.* 46, 227–234.

de las Casas-Engel, M., Domínguez-Soto, A., Sierra-Filardi, E., Bragado, R., Nieto, C., Puig-Kroger, A., Samaniego, R., Loza, M., Corcuera, M.T., Gómez-Aguado, F., et al. (2013). Serotonin Skews Human Macrophage Polarization through HTR 2B and HTR 7. *J. Immunol.* 190, 2301–2310.

Launay, J.M., Hervé, P., Peoc'h, K., Tournois, C., Callebert, J., Nebigil, C.G., Etienne, N., Drouet, L., Humbert, M., Simonneau, G., et al. (2002). Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat. Med.* 8, 1129–1135.

Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P., and Gordon, S. (1990). HETEROGENEITY IN THE DISTRIBUTION AND MORPHOLOGY OF MICROGLIA IN THE NORMAL ADULT MOUSE IBRAIN.

Lenz, K.M., and Nelson, L.H. (2018). Microglia and beyond: Innate immune cells as regulators of brain development and behavioral function. *Front. Immunol.* 9.

Li, Y., Du, X.F., Liu, C.S., Wen, Z.L., and Du, J.L. (2012). Reciprocal Regulation between Resting Microglial Dynamics and Neuronal Activity In Vivo. *Dev. Cell.*

Liang, K.J., Lee, J.E., Wang, Y.D., Ma, W., Fontainhas, A.M., Fariss, R.N., and Wong, W.T. (2009). Regulation of dynamic behavior of retinal microglia by CX3CR1 signaling. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 4444–4451.

Liu, C., Maejima, T., Wyler, S.C., Casadesus, G., Herlitze, S., and Deneris, E.S. (2010). Pet-1 is required across different stages of life to regulate serotonergic function. *Nat. Neurosci.* 13, 1190–1198.

Liu, G.D., Ding, J.Q., Xiao, Q., and Chen, S. Di (2009). P2Y6 receptor and immunoinflammation. *Neurosci. Bull.* 25, 161–164.

Loric, S., Launay, J.M., Colas, J.F., and Maroteaux, L. (1992). New mouse 5-HT₂-like receptor Expression in brain, heart and intestine. *FEBS Lett.* 312, 203–207.

Łukasiewicz, S., Błasiak, E., Faron-Górecka, A., Polit, A., Tworzydło, M., Górecki, A., Wasylewski, Z., and Dziedzicka-Wasylewska, M. (2007). Fluorescence studies of homooligomerization of adenosine A_{2A} and serotonin 5-HT_{1A} receptors reveal the specificity of receptor interactions in the plasma membrane. *Pharmacol. Reports* 59, 379–392.

Łukasiewicz, S., Faron-Górecka, A., Kędracka-Krok, S., and Dziedzicka-Wasylewska, M. (2011). Effect of clozapine on the dimerization of serotonin 5-HT_{2A} receptor and its genetic variant 5-HT_{2A}H425Y with dopamine D₂ receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 659, 114–123.

Madry, C., and Attwell, D. (2015). Receptors, ion channels, and signaling mechanisms underlying Microglial dynamics. *J. Biol. Chem.* 290, 12443–12450.

Madry, C., Arancibia-Cárcamo, I.L., Kyrargyri, V., Chan, V.T.T., Hamilton, N.B., and Attwell, D. (2018a). Effects of the ecto-ATPase apyrase on microglial ramification and surveillance reflect cell depolarization, not ATP depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E1608–E1617.

Madry, C., Kyrargyri, V., Arancibia-Cárcamo, I.L., Jolivet, R., Kohsaka, S., Bryan, R.M., and Attwell, D. (2018b). Microglial Ramification, Surveillance, and Interleukin-1 β Release Are Regulated by the Two-Pore Domain K⁺ Channel THIK-1. *Neuron* 97, 299–312.e6.

Manivet, P., Mouillet-Richard, S., Callebert, J., Nebigil, C.G., Maroteaux, L., Hosoda, S.,

- Kellermann, O., and Launay, J.M. (2000). PDZ-dependent activation of nitric-oxide synthases by the serotonin 2B receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 9324–9331.
- Maroteaux, L., and Launay, J. (1996). The 5-HT_{2B} Receptor Gene Maps Localization of the Human Kinesin Light Chain Gene (KNS2) to Chromosome 14q32 . 3 by. 172–173.
- Maroteaux, L., Béchade, C., and Roumier, A. (2019). Dimers of serotonin receptors: Impact on ligand affinity and signaling. *Biochimie* 161, 23–33.
- Martín, A., Szczupak, B., Gómez-Vallejo, V., Domercq, M., Cano, A., Padro, D., Muñoz, C., Higuchi, M., Matute, C., and Llop, J. (2015). In vivo PET imaging of the $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor as a marker for brain inflammation after cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 35, 5998–6009.
- Masson, J., Emerit, M.B., Hamon, M., and Darmon, M. (2012). Serotonergic signaling: Multiple effectors and pleiotropic effects. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* 1, 685–713.
- Mastroeni, D., Grover, A., Leonard, B., Joyce, J.N., Coleman, P.D., Kozik, B., Bellinger, D.L., and Rogers, J. (2009). Microglial responses to dopamine in a cell culture model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 30, 1805–1817.
- Masuch, A., Shieh, C.H., van Rooijen, N., van Calker, D., and Biber, K. (2016). Mechanism of microglia neuroprotection: Involvement of P2X₇, TNF α , and valproic acid. *Glia* 64, 76–89.
- Masuda, T., Sankowski, R., Staszewski, O., Böttcher, C., Amann, L., Sagar, Scheiwe, C., Nessler, S., Kunz, P., van Loo, G., et al. (2019). Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution. *Nature* 566, 388–392.
- Matcovitch-Natan, O., Winter, D.R., Giladi, A., Aguilar, S.V., Spinrad, A., Sarrazin, S., Ben-Yehuda, H., David, E., González, F.Z., Perrin, P., et al. (2016a). Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science* (80-.). 353.
- Matcovitch-Natan, O., Winter, D.R., Giladi, A., Aguilar, S.V., Spinrad, A., Sarrazin, S., Ben-Yehuda, H., David, E., González, F.Z., Perrin, P., et al. (2016b). Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science* (80-.). 353.
- Matos, M.R., Visser, E., Kramvis, I., van der Loo, R.J., Gebuis, T., Zalm, R., Rao-Ruiz, P., Mansvelder, H.D., Smit, A.B., and van den Oever, M.C. (2019). Memory strength gates the involvement of a CREB-dependent cortical fear engram in remote memory. *Nat. Commun.* 10.
- Matsumura, A., Suzuki, S., Iwahara, N., Hisahara, S., Kawamata, J., Suzuki, H., Yamauchi, A., Takata, K., Kitamura, Y., and Shimohama, S. (2015). Temporal changes of CD68 and $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor expression in microglia in Alzheimer's disease-like mouse models. *J. Alzheimer's Dis.* 44, 409–423.
- Matyash, M., Zabiegalov, O., Wendt, S., Matyash, V., and Kettenmann, H. (2017). The adenosine generating enzymes CD39/CD73 control microglial processes ramification in the mouse brain. *PLoS One* 12, e0175012.
- McCoy, M.K., and Tansey, M.G. (2008). TNF signaling inhibition in the CNS: Implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J. Neuroinflammation* 5.
- Mildner, A., Huang, H., Radke, J., Stenzel, W., and Priller, J. (2017). P2Y₁₂ receptor is expressed on human microglia under physiological conditions throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases. *Glia* 65, 375–387.

- Miyamoto, A., Wake, H., Ishikawa, A.W., Eto, K., Shibata, K., Murakoshi, H., Koizumi, S., Moorhouse, A.J., Yoshimura, Y., and Nabekura, J. (2016). Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nat. Commun.* 7.
- Monassier, L., Laplante, M.A., Jaffré, F., Bousquet, P., Maroteaux, L., and De Champlain, J. (2008). Serotonin 5-HT_{2B} Receptor blockade prevents reactive oxygen species-induced cardiac hypertrophy in mice. *Hypertension* 52, 301–307.
- Moreno, J.L., Muguruza, C., Umali, A., Mortillo, S., Holloway, T., Pilar-Cuéllar, F., Mocci, G., Seto, J., Callado, L.F., Neve, R.L., et al. (2012). Identification of three residues essential for 5-hydroxytryptamine 2A-metabotropic glutamate 2 (5-HT_{2A}-mGlu₂) receptor heteromerization and its psychoactive behavioral function. *J. Biol. Chem.* 287, 44301–44319.
- Mori, K., Ozaki, E., Zhang, B., Yang, L., Yokoyama, A., Takeda, I., Maeda, N., Sakanaka, M., and Tanaka, J. (2002). Effects of norepinephrine on rat cultured microglial cells that express α 1, α 2, β 1 and β 2 adrenergic receptors. *Neuropharmacology* 43, 1026–1034.
- Morioka, N., Tokuhara, M., Nakamura, Y., Idenoshita, Y., Harano, S., Zhang, F.F., Hisaoka-Nakashima, K., and Nakata, Y. (2014). Primary cultures of rat cortical microglia treated with nicotine increases in the expression of excitatory amino acid transporter 1 (GLAST) via the activation of the α 7 nicotinic acetylcholine receptor. *Neuroscience* 258, 374–384.
- Mosser, C.A., Baptista, S., Arnoux, I., and Audinat, E. (2017). Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future. *Prog. Neurobiol.* 149–150, 1–20.
- Moutkine, I., Quentin, E., Guiard, B.P., Maroteaux, L., and Doly, S. (2017). Heterodimers of serotonin receptor subtypes 2 are driven by 5-HT_{2C} protomers. *J. Biol. Chem.* 292, 6352–6368.
- Muzerelle, A., Scotto-Lomassese, S., Bernard, J.F., Soiza-Reilly, M., and Gaspar, P. (2016). Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5–B9) to the forebrain and brainstem. *Brain Struct. Funct.* 221, 535–561.
- Nayak, D., Roth, T.L., and McGavern, D.B. (2014). Microglia Development and Function. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 367–402.
- Nebigil, C.G., Hickel, P., Messaddeq, N., Vonesch, J.L., Douchet, M.P., Monassier, L., György, K., Matz, R., Andriantsitohaina, R., Manivet, P., et al. (2001). Ablation of serotonin 5-HT_{2B} receptors in mice leads to abnormal cardiac structure and function. *Circulation* 103, 2973–2979.
- Nebigil, C.G., Etienne, N., Messaddeq, N., and Maroteaux, L. (2003). Serotonin is a novel survival factor of cardiomyocytes: mitochondria as a target of 5-HT_{2B} receptor signaling. *FASEB J.* 17, 1373–1375.
- Neher, J.J., Neniskyte, U., Hornik, T., and Brown, G.C. (2014). Inhibition of UDP/P2Y₆ purinergic signaling prevents phagocytosis of viable neurons by activated microglia in vitro and in vivo. *Glia* 62, 1463–1475.
- Nikodemova, M., Kimyon, R.S., De, I., Small, A.L., Collier, L.S., and Watters, J.J. (2015). Microglial numbers attain adult levels after undergoing a rapid decrease in cell number in the third postnatal week. *J. Neuroimmunol.* 278, 280–288.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Neuroscience: Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* (80-.). 308, 1314–1318.
- Ohsawa, K., Irino, Y., Sanagi, T., Nakamura, Y., Suzuki, E., Inoue, K., and Kohsaka, S. (2010).

P2Y₁₂ receptor-mediated integrin- β 1 activation regulates microglial process extension induced by ATP. *Glia* 58, 790–801.

Ohsawa, K., Sanagi, T., Nakamura, Y., Suzuki, E., Inoue, K., and Kohsaka, S. (2012). Adenosine A₃ receptor is involved in ADP-induced microglial process extension and migration. *J. Neurochem.* 121, 217–227.

Okaty, B.W., Freret, M.E., Rood, B.D., Brust, R.D., Hennessy, M.L., DeBairos, D., Kim, J.C., Cook, M.N., and Dymecki, S.M. (2015). Multi-Scale Molecular Deconstruction of the Serotonin Neuron System. *Neuron* 88, 774–791.

Olson, J.K., and Miller, S.D. (2004). Microglia Initiate Central Nervous System Innate and Adaptive Immune Responses through Multiple TLRs. *J. Immunol.* 173, 3916–3924.

Orr, A.G., Orr, A.L., Li, X.J., Gross, R.E., and Traynelis, S.F. (2009). Adenosine A_{2A} receptor mediates microglial process retraction. *Nat. Neurosci.* 12, 872–878.

Pagani, F., Paolicelli, R.C., Murana, E., Cortese, B., Di Angelantonio, S., Zurolo, E., Guiducci, E., Ferreira, T.A., Garofalo, S., Catalano, M., et al. (2015). Defective microglial development in the hippocampus of Cx3cr1 deficient mice. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 1–14.

Pannell, M., Meier, M.A., Szulzewsky, F., Matyash, V., Endres, M., Kronenberg, G., Prinz, V., Waiczies, S., Wolf, S.A., and Kettenmann, H. (2016). The subpopulation of microglia expressing functional muscarinic acetylcholine receptors expands in stroke and Alzheimer's disease. *Brain Struct. Funct.* 221, 1157–1172.

Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., et al. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* (80-). 333, 1456–1458.

Parkhurst, C.N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J.N., Yates, J.R., Lafaille, J.J., Hempstead, B.L., Littman, D.R., and Gan, W.B. (2013). Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 155, 1596–1609.

Pascual, O., Achour, S. Ben, Rostaing, P., Triller, A., and Bessis, A. (2012). Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109.

Peroutka, S.J. (1995). Opioid receptors : past , present and future. *Trends Neurosci.* 18, 68–69.

Picciotto, M.R., Higley, M.J., and Mineur, Y.S. (2012). Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. *Neuron* 76, 116–129.

Pitulescu, M.E., Schmidt, I., Benedito, R., and Adams, R.H. (2010). Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice. *Nat. Protoc.* 5, 1518–1534.

Pitychoutis, P.M., Belmer, A., Moutkine, I., Adrien, J., and Maroteaux, L. (2015). Mice lacking the serotonin Htr 2B receptor gene present an antipsychotic-sensitive schizophrenic-like phenotype. *Neuropsychopharmacology* 40, 2764–2773.

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

Portas, C.M., Bjorvatn, B., and Ursin, R. (2000). Serotonin and the sleep/wake cycle: special emphasis on microdialysis studies. *Prog. Neurobiol.* 60, 13–35.

- Prosser, R.A., Miller, J.D., and Craig Heller, H. (1990). A serotonin agonist phase-shifts the circadian clock in the suprachiasmatic nuclei in vitro. *Brain Res.* 534, 336–339.
- Qian, L., Wu, H.-M., Chen, S.-H., Zhang, D., Ali, S.F., Peterson, L., Wilson, B., Lu, R.-B., Hong, J.-S., and Flood, P.M. (2011). β 2-Adrenergic Receptor Activation Prevents Rodent Dopaminergic Neurotoxicity by Inhibiting Microglia via a Novel Signaling Pathway. *J. Immunol.* 186, 4443–4454.
- Rakic, P., Bourgeois, J.P., Eckenhoff, M.F., Zecevic, N., and Goldman-Rakic, P.S. (1986). Concurrent overproduction of synapses in diverse regions of the primate cerebral cortex. *Science* (80-). 232, 232–235.
- Ramón y Cajal, S. (1897). Algo sobre la significación fisiológica de la neuroglía. *Revista Trimestral Micrográfica.* 2:33–47.
- Rappold, P.M., Lynd-Balta, E., and Joseph, S.A. (2006). P2X7 receptor immunoreactive profile confined to resting and activated microglia in the epileptic brain. *Brain Res.* 1089, 171–178.
- Rapport, M.M. (1949). Serum vasoconstrictor (serotonin) the presence of creatinine in the complex; a proposed structure of the vasoconstrictor principle. *J. Biol. Chem.* 180, 961–969.
- Rapport, M.M., Green, A.A., and Page, I.H. (1948). Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 176, 1243–1251.
- Ravichandran, K.S. (2010). Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: Progress and conundrums. *J. Exp. Med.* 207, 1807–1817.
- Renner, U., Zeug, A., Woehler, A., Niebert, M., Dityatev, A., Dityateva, G., Gorinski, N., Guseva, D., Abdel-Galil, D., Fröhlich, M., et al. (2012). Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT1A and 5-HT7 differentially regulates receptor signalling and trafficking. *J. Cell Sci.* 125, 2486–2499.
- Ribes, S., Ebert, S., Regen, T., Czesnik, D., Scheffel, J., Zeug, A., Bunkowski, S., Eiffert, H., Hanisch, U.K., Hammerschmidt, S., et al. (2010). Fibronectin stimulates Escherichia coli phagocytosis by microglial cells. *Glia* 58, 367–376.
- Robson, S.C., Sévigny, J., and Zimmermann, H. (2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.* 2, 409–430.
- Rogers, J.T., Morganti, J.M., Bachstetter, A.D., Hudson, C.E., Peters, M.M., Grimmig, B.A., Weeber, E.J., Bickford, P.C., and Gemma, C. (2011). CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 31, 16241–16250.
- Romero, G., Von Zastrow, M., and Friedman, P.A. (2011). Role of PDZ Proteins in Regulating Trafficking, Signaling, and Function of GPCRs. *Means, Motif, and Opportunity* (Elsevier Inc.).
- Roth, B.L. (2016). DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* 89, 683–694.
- Rothman, R.B., Baumann, M.H., Savage, J.E., Rauser, L., McBride, A., Hufeisen, S.J., and Roth, B.L. (2000). Evidence for possible involvement of 5-HT(2B) receptors in the cardiac valvulopathy associated with fenfluramine and other serotonergic medications. *Circulation* 102, 2836–2841.
- Dello Russo, C., Boullerne, A.I., Gavrilyuk, V., and Feinstein, D.L. (2004). Inhibition of microglial inflammatory responses by norepinephrine: Effects on nitric oxide and interleukin-1 β production. *J. Neuroinflammation* 1.

- Salim, K., Fenton, T., Bacha, J., Urien-Rodriguez, H., Bonnert, T., Skynner, H.A., Watts, E., Kerby, J., Heald, A., Beer, M., et al. (2002). Oligomerization of G-protein-coupled receptors shown by selective co-immunoprecipitation. *J. Biol. Chem.* *277*, 15482–15485.
- Samokhvalov, I.M., Samokhvalova, N.I., and Nishikawa, S.I. (2007). Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis. *Nature* *446*, 1056–1061.
- Sandén, N., Thorlin, T., Blomstrand, F., Persson, P.A.I., and Hansson, E. (2000). 5-Hydroxytryptamine(2B) receptors stimulate Ca²⁺ increases in cultured astrocytes from three different brain regions. In *Neurochemistry International*, pp. 427–434.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., et al. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* (80-). *301*, 805–809.
- Savchenko, V.L., McKanna, J.A., Nikonenko, I.R., and Skibo, G.G. (2000). Microglia and astrocytes in the adult rat brain: Comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. *Neuroscience* *96*, 195–203.
- Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Barres, B.A., and Stevens, B. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron* *74*, 691–705.
- Schilling, T., Quandt, F.N., Cherny, V. V., Zhou, W., Heinemann, U., Decoursey, T.E., and Eder, C. (2000). Upregulation of Kv1.3 K⁺ channels in microglia deactivated by TGF- β . *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* *279*, 1123–1134.
- Schilling, T., Nitsch, R., Heinemann, U., Haas, D., and Eder, C. (2001). Astrocyte-released cytokines induce ramification and outward K⁺ channel expression in microglia via distinct signalling pathways. *Eur. J. Neurosci.* *14*, 463–473.
- Schmuck, K., Ullmer, C., Engels, P., and Lübbert, H. (1994). Cloning and functional characterization of the human 5-HT_{2B} serotonin receptor. *FEBS Lett.* *342*, 85–90.
- Schneider, B., Pietri, M., Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Mutel, V., Launay, J.M., and Kellermann, O. (2006). Control of bioamine metabolism by 5-HT_{2B} and α 1D autoreceptors through reactive oxygen species and tumor necrosis factor- α signaling in neuronal cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1091*, 123–141.
- Schwarz, J.M., Smith, S.H., and Bilbo, S.D. (2013). FACS analysis of neuronal-glia interactions in the nucleus accumbens following morphine administration. *Psychopharmacology (Berl)*. *230*, 525–535.
- Sengupta, A., Bocchio, M., Bannerman, D.M., Sharp, T., and Capogna, M. (2017). Control of amygdala circuits by 5-HT neurons via 5-HT and glutamate cotransmission. *J. Neurosci.* *37*, 1785–1796.
- Sharaf, A., Krieglstein, K., and Spittau, B. (2013). Distribution of microglia in the postnatal murine nigrostriatal system. *Cell Tissue Res.* *351*, 373–382.
- Shytle, R.D., Mori, T., Townsend, K., Vendrame, M., Sun, N., Zeng, J., Ehrhart, J., Silver, A.A., Sanberg, P.R., and Tan, J. (2004). Cholinergic modulation of microglial activation by α 7 nicotinic receptors. *J. Neurochem.* *89*, 337–343.
- Sierra, A., Encinas, J.M., Deudero, J.J.P., Chancey, J.H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche,

- L.S., Tsirka, S.E., and Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7, 483–495.
- Sierra, A., Paolicelli, R.C., and Kettenmann, H. (2019). Cien Años de Microglía: Milestones in a Century of Microglial Research. *Trends Neurosci.* 42, 778–792.
- Sievers, J., Parwaresch, R., and Wottge, H. -U (1994). Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: Morphology. *Glia* 12, 245–258.
- Smith Baxter, G. (1995). Novel discriminatory ligands for 5-HT_{2B} receptors. *Behav. Brain Res.* 73, 149–152.
- Smolders, S.M.T., Kessels, S., Vanganswinkel, T., Rigo, J.M., Legendre, P., and Brône, B. (2019). Microglia: Brain cells on the move. *Prog. Neurobiol.* 178.
- Stowell, R.D., Wong, E.L., Batchelor, H.N., Mendes, M.S., Lamantia, C.E., Whitelaw, B.S., and Majewska, A.K. (2018). Cerebellar microglia are dynamically unique and survey Purkinje neurons in vivo. *Dev. Neurobiol.* 78, 627–644.
- Stratoulas, V., Venero, J.L., Tremblay, M., and Joseph, B. (2019). Microglial subtypes: diversity within the microglial community. *EMBO J.* 38, 1–18.
- Stremmel, C., Schuchert, R., Wagner, F., Thaler, R., Weinberger, T., Pick, R., Mass, E., Ishikawa-Ankerhold, H.C., Margraf, A., Hutter, S., et al. (2018). Yolk sac macrophage progenitors traffic to the embryo during defined stages of development. *Nat. Commun.* 9.
- Sugino, H., Futamura, T., Mitsumoto, Y., Maeda, K., and Marunaka, Y. (2009). Atypical antipsychotics suppress production of proinflammatory cytokines and up-regulate interleukin-10 in lipopolysaccharide-treated mice. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 33, 303–307.
- Szlachta, M., Kuśmider, M., Pabian, P., Solich, J., Kolasa, M., Żurawek, D., Dziejicka-Wasylewska, M., and Faron-Górecka, A. (2018). Repeated clozapine increases the level of serotonin 5-HT_{1A} R heterodimerization with 5-HT_{2A} or dopamine D₂ receptors in the mouse cortex. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 1–14.
- Tan, Y.L., Yuan, Y., and Tian, L. (2019). Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Mol. Psychiatry*.
- Tanaka, J., and Maeda, N. (1996). Microglial ramification requires nondiffusible factors derived from astrocytes. In *Experimental Neurology*, pp. 367–375.
- Tanaka, K.F., Kashima, H., Suzuki, H., Ono, K., and Sawada, M. (2002). Existence of functional β ₁- and β ₂-adrenergic receptors on microglia. *J. Neurosci. Res.* 70, 232–237.
- Taupin, P., and Gage, F.H. (2002). Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J. Neurosci. Res.* 69, 745–749.
- Tay, T.L., Béchade, C., D’Andrea, I., St-Pierre, M.K., Henry, M.S., Roumier, A., and Tremblay, M.E. (2018). Microglia gone rogue: Impacts on psychiatric disorders across the lifespan. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 421.
- Teissier, A., Chemiakine, A., Dymecki, S.M., Moore, H., Ansorge, M.S., Inbar, B., Bagchi, S., Ray, R.S., and Palmiter, R.D. (2015). Activity of Raphé Serotonergic Neurons Controls Emotional Behaviors Correspondence Article Activity of Raphé Serotonergic Neurons Controls Emotional Behaviors. *Cell Rep.* 13.

- Thompson, K.J., Khajehali, E., Bradley, S.J., Navarrete, J.S., Huang, X.P., Slocum, S., Jin, J., Liu, J., Xiong, Y., Olsen, R.H.J., et al. (2018). DREADD Agonist 21 Is an Effective Agonist for Muscarinic-Based DREADDs in Vitro and in Vivo. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* *1*, 61–72.
- Tournois, C., Mutel, V., Manivet, P., Launay, J.M., and Kellermann, O. (1998). Cross-talk between 5-hydroxytryptamine receptors in a serotonergic cell line. Involvement of arachidonic acid metabolism. *J. Biol. Chem.* *273*, 17498–17503.
- Tremblay, M.È., Lecours, C., Samson, L., Sánchez-Zafra, V., and Sierra, A. (2015). From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. *Front. Neuroanat.* *9*, 1–10.
- Tremblay, M.È., Lowery, R.L., and Majewska, A.K. (2010). Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol.* *8*, e1000527.
- Trinchieri, G., and Sher, A. (2007). Pattern-recognition receptor Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. | Immunol.* *7*.
- Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W., and Inoue, K. (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* *424*, 778–783.
- Twarog, B.M., and Page, I.H. (1953). Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am. J. Physiol.* *175*, 157–161.
- Ulmann, L., Hatcher, J.P., Hughes, J.P., Chaumont, S., Green, P.J., Conquet, F., Buell, G.N., Reeve, A.J., Chessell, I.P., and Rassendren, F. (2008). Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J. Neurosci.* *28*, 11263–11268.
- Ulmann, L., Levavasseur, F., Avignone, E., Peyroutou, R., Hirbec, H., Audinat, E., and Rassendren, F. (2013). Involvement of P2X4 receptors in hippocampal microglial activation after status epilepticus. *Glia* *61*, 1306–1319.
- Umbriaco, D., Garcia, S., Beaulieu, C., and Descarries, L. (1995). Relational features of acetylcholine, noradrenaline, serotonin and GABA axon terminals in the stratum radiatum of adult rat hippocampus (CA1). *Hippocampus* *5*, 605–620.
- Urban, D.J., and Roth, B.L. (2015). DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs): Chemogenetic Tools with Therapeutic Utility. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *55*, 399–417.
- Ursin, R. (2002). Serotonin and sleep. *Sleep Med. Rev.* *6*, 55–67.
- Vanover, K.E., Harvey, S.C., Son, T., Bradley, S.R., Kold, H., Makhay, M., Veinbergs, I., Spalding, T.A., Weiner, D.M., Andersson, C.M., et al. (2004). Pharmacological characterization of AC-90179 [2-(4-methoxy-phenyl)-N-(4-methyl-benzyl)-N-(1-methyl-piperidin-4-yl)-acetamide hydrochloride]: A selective serotonin 2A receptor inverse agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *310*, 943–951.
- Virchow, R. (1856). *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin.*
- Voisin, A.N., Mnie-Filali, O., Giguère, N., Fortin, G.M., Vigneault, E., El Mestikawy, S., Descarries, L., and Trudeau, L.É. (2016). Axonal segregation and role of the vesicular glutamate transporter VGLUT3 in serotonin neurons. *Front. Neuroanat.* *10*, 1–17.
- Vukovic, J., Colditz, M.J., Blackmore, D.G., Ruitenber, M.J., and Bartlett, P.F. (2012).

- Microglia modulate hippocampal neural precursor activity in response to exercise and aging. *J. Neurosci.* 32, 6435–6443.
- Wainscott, D.B., Cohen, M.L., Schenck, K.W., Audia, J.E., Nissen, J.S., Baez, M., Kursar, J.D., Lucaites, V.L., and Nelson, D.L. (1993). Pharmacological characteristics of the newly cloned rat 5- hydroxytryptamine(2F) receptor. *Mol. Pharmacol.* 43, 419–426.
- Wainscott, D.B., Lucaites, V.L., Kursar, J.D., Baez, M., and Nelson, D.L. (1996). Pharmacologic characterization of the human 5-hydroxytryptamine2B receptor: Evidence for species differences. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276, 720–727.
- Walther, D.J., and Bader, M. (2003). A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1673–1680.
- Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amelia, C.A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J.H., Wang, H., Yang, N., Ulloa, L., et al. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421, 384–388.
- Weiger, W.A. (1997). Serotonergic Modulation of Behaviour: a Phylogenetic Overview. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 72, 61–95.
- Whitaker-Azmitia, P.M. (1999). The discovery of serotonin and its role in neuroscience. *Neuropsychopharmacology* 21, 2S-8S.
- White, S.R., Fung, S.J., Jackson, D.A., and Imel, K.M. (1996). Serotonin, norepinephrine and associated neuropeptides: Effects on somatic motoneuron excitability. *Prog. Brain Res.* 107, 183–199.
- Winstanley, C.A., Eagle, D.M., and Robbins, T.W. (2006). Behavioral models of impulsivity in relation to ADHD: Translation between clinical and preclinical studies. *Clin. Psychol. Rev.* 26, 379–395.
- Wu, L.J., Vadakkan, K.I., and Zhuo, M. (2007). ATP-induced chemotaxis of microglial processes requires P2Y receptor-activated initiation of outward potassium currents. *Glia* 55, 810–821.
- Wyler, S.C., Spencer, W.C., Green, N.H., Rood, B.D., Crawford, L.T., Craige, C., Gresch, P., McMahan, D.G., Beck, S.G., and Deneris, E. (2016). Pet-1 switches transcriptional targets postnatally to regulate maturation of serotonin neuron excitability. *J. Neurosci.* 36, 1758–1774.
- Xie, A.X., Petravic, J., and McCarthy, K.D. (2015). Molecular approaches for manipulating astrocytic signaling in vivo. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 144.
- Yang, X., Lou, Y., Liu, G., Wang, X., Qian, Y., Ding, J., Chen, S., and Xiao, Q. (2017). Microglia P2Y6 receptor is related to Parkinson's disease through neuroinflammatory process. *J. Neuroinflammation* 14, 38.
- Yue, N., Huang, H., Zhu, X., Han, Q., Wang, Y., Li, B., Liu, Q., Wu, G., Zhang, Y., and Yu, J. (2017). Activation of P2X7 receptor and NLRP3 inflammasome assembly in hippocampal glial cells mediates chronic stress-induced depressive-like behaviors. *J. Neuroinflammation* 14.
- Zhan, Y., Paolicelli, R.C., Sforzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., Vyssotski, A.L., Bifone, A., Gozzi, A., Ragozzino, D., et al. (2014). Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat. Neurosci.* 17, 400–406.
- Zhang, L., McLarnon, J.G., Goghari, V., Lee, Y.B., Kim, S.U., and Krieger, C. (1998). Cholinergic agonists increase intracellular Ca²⁺ in cultured human microglia. *Neurosci. Lett.*

255, 33–36.

Zhang, X., Xu, P., Li, C., Zhu, W., Wu, S., Yu, A., Ding, Y., Wang, Q., and Zhang, Z. (2017). Spinal microglial P2X₄ receptor-brain-derived neurotrophic factor signaling regulates nicotine withdrawal-induced hyperalgesia. *Neuroreport* 28, 339–347.

Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S.A., Bennett, M.L., Scholze, A.R., Phatnani, H.P., Paolo Guarnieri, X., Caneda, C., Ruderisch, N., Deng, S., et al. (2014). Cellular/Molecular An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* 34, 11929–11947.

Zhang, Z., Artelt, M., Burnet, M., Trautmann, K., and Schluesener, H.J. (2006). Lesional accumulation of P2X₄ receptor⁺ monocytes following experimental traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 197, 252–257.

Zhao, Y., Wu, X., Li, X., Jiang, L.L., Gui, X., Liu, Y., Sun, Y., Zhu, B., Piña-Crespo, J.C., Zhang, M., et al. (2018). TREM2 Is a Receptor for β -Amyloid that Mediates Microglial Function. *Neuron* 97, 1023-1031.e7.

Zoli, M., Jansson, A., Syková, E., Agnati, L.F., and Fuxe, K. (1999). Volume transmission in the CNS and its relevance for neuropsychopharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 142–150.

Zopf, D.A., Neves, L.A.A.D., Nikula, K.J., Huang, J., Senese, P.B., and Gralinski, M.R. (2011). C-122, a novel antagonist of serotonin receptor 5-HT 2B, prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 670, 195–203.

Zusso, M., Methot, L., Lo, R., Greenhalgh, A.D., David, S., and Stifani, S. (2012). Regulation of postnatal forebrain amoeboid microglial cell proliferation and development by the transcription factor runx1. *J. Neurosci.* 32, 11285–11298.