

## Thesis, COLLÉGIALITÉ

**Auteur** : Dardenne, Elisa

**Promoteur(s)** : Cornil, Charlotte

**Faculté** : Faculté de Médecine

**Diplôme** : Master en sciences biomédicales, à finalité spécialisée en biomédical data management

**Année académique** : 2021-2022

**URI/URL** : <http://hdl.handle.net/2268.2/14871>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---



Université de Liège - Faculté de Médecine

Année académique 2021-2022

Etude du rôle de la microglie dans la  
différenciation sexuelle du cerveau  
chez la caille japonaise (*Coturnix  
Japonica*)

GIGA Neurosciences

Laboratoire de Neuroendocrinologie

Mémoire présenté par Elisa Dardenne en vue de l'obtention du grade de Master en  
Sciences Biomédicales

Promotrice : Charlotte Cornil





Université de Liège - Faculté de Médecine

Année académique 2021-2022

Etude du rôle de la microglie dans la  
différenciation sexuelle du cerveau  
chez la caille japonaise (*Coturnix  
Japonica*)

GIGA Neurosciences

Laboratoire de Neuroendocrinologie

Mémoire présenté par Elisa Dardenne en vue de l'obtention du grade de Master en  
Sciences Biomédicales

Promotrice : Charlotte Cornil

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma promotrice Charlotte Cornil de m'avoir offert l'opportunité de réaliser mon mémoire dans son laboratoire. Vous m'avez fait découvrir le monde de la recherche scientifique et ses mésaventures. J'ai adoré ces 6 mois passés aux cotés de l'équipe de Neuroendocrinologie, c'était très enrichissant et épanouissant. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir laissée gérer le projet avec tant de liberté et d'autonomie. Et enfin, merci pour vos encouragements et votre accompagnement dans l'avancement de mon travail ;

Je remercie également Delphine Franssen pour le temps que tu m'as accordée quand je suis arrivée. Merci de m'avoir initiée aux manipulations de labo et aux qPCR. Je te suis très reconnaissante. Merci également à Ellen pour ton aide lors des dissections. Enfin, je tiens à remercier l'ensemble du laboratoire de Neuroendocrinologie. Merci à tous pour l'aide que vous avez pu apporter à ce projet. Et plus personnellement, c'était très chouette de discuter avec chacun de vous, vous êtes tous très inspirant ;

Merci à mes amies et mon amoureux qui ont rendu ces années d'étude plus agréables, plus riches et plus festives. Merci d'avoir partagé ces aventures avec moi. Merci à Manon pour tes relectures et ton implication ;

Pour finir, je remercie également ma famille, mes parents pour leur soutien et leur confiance. Ma mère, de m'avoir initiée depuis mon plus jeune âge au domaine de la santé, et pour tes relectures. Ma sœur, de m'avoir encouragée et motivée. Mes grands-parents, pour tout cet amour que vous nous donnez ;

Merci à tous les enseignants pour ces années d'étude riches en découvertes.

## Abstract

Brain sexual differentiation is a process governed by sex steroid hormones that establishes sexual differences in the nervous system during a sensitive period. Estrogens play a key role in this process both in mammals and birds, although the effects of estrogens go in opposite directions in the two vertebrate classes. They masculinize and de-feminize the brain and behavior in rodents, whereas they induce demasculinization in birds. Microglia, the specific macrophages to the brain region, seems to be involved since inhibiting them prevents the masculinizing action of estrogens. Moreover, it is found in larger quantities in the brains of male rodents during the sensitive period. In birds, the opposite is observed: microglia are more abundant in female embryos and this difference depends on estrogen exposure. The Japanese quail model provides unique opportunities to decipher the role of microglia in brain sexual programming, since the hormones involved are the same as in rodents, this species has a sensitive embryonic period and as opposed to rodents, the *in ovo* development occurs without maternal influence.

The present research aimed to understand the role of microglial cells in brain sexual differentiation. For this purpose, marker genes for microglia activity and abundance were selected to study the functional and inflammatory profile of microglia, and marker genes for microglia classification were also selected to compare their developmental expression with rodents. In addition, treatments with an estrogen or an estrogen synthesis inhibitor were applied to test a potential effect on microglial activity. qPCR was performed on hypothalami (and preoptic area) from male and female embryos at different stages of embryonic development until the first day of life. For a marker gene of microglial activity, a difference between males and females was highlighted, so a second experiment was performed testing the activity of this gene under the two conditions mentioned above.

The results showed that the expression of genes indicative of the quantity of microglial cells increases with developmental age suggesting that the amount of microglia increases during embryonic development, without showing any difference between males and females. The early microglia and pre-microglia classification of quail is not similar to that of rodents. During the sensitive period, the expression of the IL1 $\beta$  gene, a marker of microglial activity, differs between the sexes, suggesting that microglial activity differs between the sexes at this time. However, no effect of estrogens and inhibitors of their synthesis was observed on IL1 $\beta$  expression, and by extension on microglial activity.

## Résumé

La différenciation sexuelle du cerveau est un processus régi par les hormones stéroïdiennes sexuelles qui établit des différences sexuelles dans le système nerveux au cours d'une période sensible. Les œstrogènes jouent un rôle clé dans ce processus chez les mammifères et les oiseaux., mais leur effet est opposé entre ces deux classes de vertébrés. Chez les mammifères, ils masculinisent et déféminisent le cerveau et le comportement, alors qu'ils induisent une démasculinisation chez les oiseaux. La microglie, macrophages propres au cerveau, semble impliquée dans ce processus puisqu'une inhibition de celle-ci prévient l'action masculinisante des œstrogènes, elle est également présente en plus grande quantité dans le cerveau des rongeurs mâles au cours de la période sensible. Chez les oiseaux, l'inverse est observé : la microglie est plus abondante chez les embryons femelles et cette différence dépend de l'exposition aux œstrogènes. La caille japonaise offre un modèle de choix pour comprendre le rôle de la microglie dans la différenciation sexuelle du cerveau, puisque les hormones impliquées sont les mêmes que pour le rongeur, cette espèce possède une période sensible embryonnaire et, contrairement aux rongeurs, le développement *in ovo* se déroule sans influence maternelle.

La présente recherche visait à comprendre le rôle des cellules microgliales dans la différenciation sexuelle du cerveau. Pour ce faire, des gènes marqueurs d'activité et d'abondance de la microglie ont été sélectionnés afin d'étudier le profil fonctionnel et inflammatoire de la microglie. Des gènes marqueurs de classification de la microglie ont également été sélectionnés pour la comparer à celle des rongeurs. Parallèlement, des traitements à l'œstradiol ou un inhibiteur de synthèse d'œstradiol, ont été appliqués afin d'observer un potentiel effet sur l'activité microgliale. Des qPCR ont été réalisées sur des hypothalami (et aire pré optiques) issu d'embryons mâles et femelles à différents jours de développement embryonnaire jusqu'au 1<sup>er</sup> jour de vie. Pour un gène marqueur d'activité microgliale, une différence entre mâles et femelles a été mise en évidence, c'est pourquoi une seconde expérience a été réalisée en testant l'activité de ce gène sous les deux conditions citées précédemment.

Les résultats ont montré que l'expression de gènes spécifiques de la microglie augmente avec l'âge développemental suggérant que la quantité de microglie augmente au cours du développement embryonnaire, sans montrer de différences entre les mâles et les femelles. La classification en microglie précoce et pré-microglie des cailles n'est pas similaire à celle des rongeurs. Pendant la période sensible, l'expression du gène IL1 $\beta$ , marqueur de l'activité microgliale, diffère entre les sexes, suggérant que l'activité microgliale diffère entre les sexes à cette période. Par contre, aucun effet des œstrogènes et des inhibiteurs de leurs synthèse n'a été observé sur l'expression de IL1 $\beta$ , et par extension sur l'activité microgliale.

## Liste des abréviations & acronymes

|              |   |
|--------------|---|
| ACT          | Gène de l'actine  |
| AVPV         | Noyau périventriculaire antéro-ventral                          |
| BDNF         | Facteur neurotrophique dérivé du cerveau                        |
| BHE          | Barrière hémato-encéphalique                                    |
| BST/ BNST    | Noyau du lit de la strie terminale                              |
| COX          | Cyclooxygénase  |
| CSF1/ M-CSF1 | Facteur 1 du stimulant des colonies de macrophages              |
| CSF1 R       | Récepteur du facteur de stimulation des colonies de macrophages |
| DAB2         | Protéine adaptatrice 2  |
| E9           | Jour embryonnaire 9   |
| EB           | Œstradiol benzoate  |
| HPOA         | Hypothalamus et aire pré-optique                                |
| IGF1         | Facteur de croissance insuline-like 1                           |
| IL1B         | Interleukine 1 beta   |
| IL10         | Interleukine 10   |
| IL34         | Interleukine 34   |
| MCM5         | Composant 5 du complexe de maintenance des minichromosomes      |
| M-CSFR       | Récepteur du facteur de stimulation des colonies de macrophages |
| PGE2         | Prostaglandine E2   |
| POA          | Aire pré-optique  |
| POM          | Noyau pré-optique médian  |
| PN1/P1       | Jour postnatal 1  |
| ROS          | Espèces réactives à l'oxygène                                   |
| RT           | Transcription inverse   |
| SDN-POA      | Noyau sexuellement dimorphique de l'aire pré-optique            |
| SL           | Septum latéral  |
| SNC          | Système nerveux central   |



## Table des matières

|  |    |
|--|----|
| Introduction .....   |    |
| 1. Contexte .....  | 1  |
| 2. La microglie .....  | 3  |
| 2.1. Historique, origine et définition .....   | 3  |
| 2.2. Le développement de la microglie .....  | 3  |
| 2.2.1. Les différents morphotypes .....  | 4  |
| 2.2.2. Hétérogénéité de la microglie .....   | 4  |
| 2.2.3. Les rôles de la microglie dans le développement du cerveau .....                                      | 6  |
| 2.3. Rôle de la microglie adulte .....   | 7  |
| 3. La différenciation sexuelle .....   | 8  |
| 3.1. Les hormones stéroïdiennes .....  | 8  |
| 3.1.1. Les androgènes .....  | 8  |
| 3.1.2. Les œstrogènes .....  | 8  |
| 3.1.3. L'aromatisation .....   | 9  |
| 3.2. La différenciation sexuelle chez les mammifères .....   | 9  |
| 3.2.1. La différenciation sexuelle du cerveau des rongeurs .....   | 10 |
| 3.2.2. La différenciation sexuelle du cerveau chez l'oiseau .....  | 11 |
| 3.3. Les différences sexuelles dans le cerveau des rongeurs .....  | 12 |
| 3.4. Les différences sexuelles dans le cerveau des cailles .....   | 13 |
| 3.5. Les mécanismes de la différenciation sexuelle du cerveau .....  | 13 |
| 4. Implication du système immunitaire dans la différenciation sexuelle du cerveau et du comportement .....   | 13 |
| 4.1. Activité sécrétoire des cellules immunitaires dans le contexte de la différenciation du cerveau .....   | 14 |
| 4.2. Activité phagocytaire des cellules immunitaires dans le contexte de la différenciation du cerveau ..... | 15 |
| 5. Justification de la caille japonaise comme modèle .....   | 16 |
| Hypothèses, Objectifs et Stratégie .....   |    |
| 1. Hypothèses de travail .....   | 17 |
| 2. Objectifs poursuivis .....  | 17 |
| 3. Stratégie expérimentale utilisée pour répondre aux objectifs .....  | 17 |
| Matériel et méthodes .....   |    |
| 1. Expérience 1 .....  | 18 |
| 1.1. Animaux .....   | 18 |
| 1.2. Collecte des échantillons .....   | 18 |
| 1.3. Recherche et validation des couples d'amorces pour les gènes d'intérêt .....                            | 20 |
| 1.4. Extraction d'ARN .....  | 21 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.5.   | La Reverse Transcription.....   | 21 |
| 1.6.   | La qPCR en temps réel.....  | 21 |
| 1.7.   | Méthode d'analyse et gènes de référence .....   | 22 |
| 1.8.   | Analyse statistique.....  | 23 |
| 2.     | Expérience 2.....   | 23 |
| 2.1.   | Animaux .....   | 23 |
| 2.2.   | Traitement <i>in ovo</i> .....  | 24 |
| 2.3.   | Collecte des échantillons et biologie moléculaire .....   | 24 |
| 2.4.   | Normalisation et analyse.....   | 24 |
| 2.5.   | Analyse statistique.....  | 24 |
|        | Résultats .....   |    |
| 1.     | Expérience 1 : Evolution de l'expression des gènes spécifiques de la microglie et de leur activité au cours du développement embryonnaire chez les mâles et les femelles..... | 25 |
| 1.1.   | Les gènes marqueurs de la quantité de microglie .....   | 25 |
| 1.1.1. | DAB 2.....  | 25 |
| 1.1.2. | CSF1R.....  | 25 |
| 1.1.3. | IL-34 .....   | 25 |
| 1.1.4. | MCM5.....   | 26 |
| 1.1.5. | RUNX-1.....   | 26 |
| 2.1.   | Les gènes marqueurs de l'activité microgliale.....  | 27 |
| 2.1.1. | IL-10.....  | 27 |
| 2.1.2. | IL-1 Beta.....  | 27 |
| 2.     | Expérience 2 : Rôle des œstrogènes sur l'activité microgliale par l'expression d'IL1 $\beta$ .....  | 28 |
| 2.1.   | Comparaison des conditions contrôles .....  | 28 |
| 2.2.   | Effet d'une exposition précoce à l'œstradiol benzoate (EB) .....  | 29 |
| 2.3.   | Effet de l'inhibition précoce de la synthèse d'œstrogènes.....  | 30 |
|        | Discussion.....   |    |
| 1.     | La quantité de microglie évolue au cours du temps mais ne diffère pas entre les sexes   | 31 |
| 2.     | Le profil microglial des caillies n'est pas identique à celui des rongeurs au cours du développement .....  | 32 |
| 3.     | L'expression d'IL1 $\beta$ de la microglie diffère entre les sexes au cours de la période sensible .....  | 33 |
| 4.     | Absence d'effet d'une manipulation des œstrogènes sur l'activité de la microglie.....   | 34 |
| 5.     | Investigation future : 1 <sup>er</sup> jour de vie .....  | 36 |
|        | Conclusions et perspectives.....  |    |
|        | Bibliographie .....   |    |
|        | Annexe.....   |    |

1. Complément d'information sur la microglie .....
- 1.1. Forme surveillante .....
- 1.2. Forme activée.....
- 1.3. Implication de la microglie dans les maladies neurodégénératives et  
psychiatriques .....

# Introduction

## 1. Contexte

Chez les vertébrés, de nombreuses différences distinguent les mâles et les femelles. Il peut s'agir de différences d'ordre morphologiques telles que la taille ou la musculature, physiologiques, comme la répartition corporelle de la masse grasseuse, ou encore cognitives, comme la capacité à s'orienter dans l'espace. Des différences sexuelles existent aussi au niveau de l'incidence, des symptômes et des traitements de certaines maladies, et notamment des maladies neurologiques. Les femmes seraient plus susceptibles de présenter un trouble émotionnel qui se développerait après la puberté, alors que les hommes seraient plus touchés par des troubles développementaux qui induiraient des maladies mentales (Thibaut, 2016). Globalement, les hommes sont plus affectés par les troubles du spectre autistique (jusqu'à 4 fois plus) (Fombonne, 2003 ; Hiller et al., 2016; van Wijngaarden-Cremers et al., 2014), la schizophrénie (Aleman et al., 2003), mais aussi le trouble de l'hyperactivité avec déficit de l'attention (3 fois plus) (Bálint et al., 2009; Catalá-López et al., 2012). Quant aux femmes, elles seraient plus touchées par le trouble anxieux et la dépression (2 fois plus) (Altemus et al., 2014 ; Kessler et al., 1993). Elles présenteraient également une réponse plus robuste du système immunitaire, en conséquence, elles sont plus susceptibles de développer des maladies auto-immunes comme la sclérose en plaque (Klein, 2000; McMillen, 1979). Des informations supplémentaires à ce sujet sont disponibles en annexe. La compréhension des mécanismes qui sous-tendent l'émergence de ces différences constitue donc une question de santé publique importante.

Ces différences sexuelles découlent d'un processus nommé : « la différenciation sexuelle ». Il permet à un organisme, un tissu ou une cellule au cours du développement d'acquies et de montrer des caractéristiques typiques mâles ou femelles. Un exemple concret est la différenciation sexuelle des organes génitaux. La différenciation sexuelle du cerveau et du comportement est donc ce mécanisme qui permet au cerveau de développer des caractéristiques typiques de son sexe et de montrer à l'âge adulte le comportement adapté au sexe.

Au niveau du cerveau, la différenciation sexuelle est initiée par les hormones stéroïdiennes sexuelles. Une différence entre mâles et femelles dans la concentration en hormones durant une fenêtre de temps précise au cours du développement, nommé « la période sensible », est responsable de la différenciation du cerveau et de l'établissement du comportement typique à l'âge adulte (Raisman & Field, 1973). Les mécanismes par lesquels les hormones affectent le cerveau ne sont pas encore tous compris, mais les hormones pourraient agir soit via des mécanismes épigénétiques, soit en influençant la migration et les connexions cellulaires, ou encore en influençant le nombre et la taille de

cellules cibles (Lenz et al., 2012). Alors que la plupart des travaux se focalisaient sur l'effet des hormones sur les neurones, des recherches ont montré que les prostaglandines peuvent avoir le même impact sur la différenciation sexuelle du cerveau que les stéroïdes (Amateau & McCarthy, 2004). Cette découverte a initié les recherches sur la microglie, qui sécrète des prostaglandines (Lenz et al., 2013). Ces travaux réalisés sur des modèles de rongeurs ont révélé que la microglie est plus active et plus abondante dans le cerveau des mâles au cours de la période sensible uniquement (Schwarz et al., 2012), suggérant que la microglie pourrait médier l'action des hormones dans la différenciation sexuelle du cerveau. Cependant, étant donné l'implication de molécules neuro-inflammatoires dans le processus de différenciation, le développement des embryons *in utero* pourrait aussi être influencé par le système immunitaire de la mère (McCarthy, 2019). Par conséquent, un modèle aviaire avec un développement *in ovo* permet d'étudier ces questions indépendamment de l'influence de l'environnement maternel. Chez la caille, la période sensible s'étend du jour embryonnaire 6 à 12 (Carere & Balthazart, 2007), et la microglie colonise le cerveau à partir du jour embryonnaire 9 (Cuadros et al., 1993). Dans le noyau pré-optique médian (POM) des femelles, un marquage immunohistochimique a mis en évidence une quantité plus importante de microglie « en transition » et, dans une moindre mesure « amiboïde », du jour embryonnaire 9 (E9) au 12 (Delage & Cornil, 2020). Comme chez les rongeurs, cette différence dépend de l'exposition précoce aux œstrogènes.

Toutefois, de nouvelles questions émergent, notamment de savoir comment la microglie interagit et avec quoi pour exercer son rôle dans la différenciation sexuelle du cerveau. Pendant le développement, par son activité phagocytaire et la sécrétion de cytokines, la microglie participe à la neurogenèse, la mort cellulaire et l'élagage de synapses. Ces processus sont impliqués dans la différenciation sexuelle mais ils restent encore peu connus, en particulier chez l'oiseau.

Le but de ce mémoire consiste donc à étudier le profil d'expression de la microglie d'embryons de cailles mâles et femelles au cours de leur développement, en mesurant par qPCR l'expression de gènes marqueurs d'abondance et d'activité de la microglie. Le profil d'expression de ces gènes fournira des indications sur l'évolution de la microglie au cours du développement et entre les sexes, il apportera des éléments importants à la compréhension du rôle de la microglie dans la différenciation sexuelle. Ce travail donnera également des indices sur les similitudes et les différences entre espèces des processus impliqués.

## 2. La microglie

### 2.1. Historique, origine et définition

Pío del Río-Hortega est le premier chercheur à avoir décrit en 1919 les cellules microgliales et les oligodendrocytes distinctement de la glie nerveuse. Avant cela, les cellules gliales étaient considérées comme une matrice de soutien pour les neurones, mais elles n'étaient pas considérées individuellement (Sierra et al., 2016). Nous savons maintenant que les cellules gliales sont composées des astrocytes, de la microglie et des oligodendrocytes. Leurs rôles consistent à supporter et protéger les neurones, et former de la gaine de myéline (Jessen, 2004). Cependant, les cellules microgliales (ou microglie) sont différentes de leurs homologues gliales que ce soit en termes de fonction, d'origine ou de morphologie. En effet, les cellules microgliales sont les macrophages propres au système nerveux central. Ces cellules de l'immunité innée sont donc responsables de la défense immunitaire et du maintien de l'homéostasie du cerveau. Elles sont également impliquées dans le développement du cerveau aussi bien en condition physiologique que pathologique. Elles représentent 5 à 10% de la population cellulaire du cerveau (Thion & Garel, 2017).

Ces cellules microgliales proviennent de progéniteurs de la lignée myéloïde, présents dans le sac vitellin et sont donc d'origine mésodermique, contrairement aux cellules gliales et aux neurones qui proviennent du neuroectoderme (Kettenmann et al., 2011). Les cellules microgliales n'ont pas non plus la même origine que les macrophages périphériques ou d'autres types de macrophages comme les cellules de Kupffer dans le foie ou les macrophages alvéolaires dans les poumons (Sheng et al., 2015). Ainsi, les cellules microgliales ont une origine et une fonction unique.

### 2.2. Le développement de la microglie

Comme dit précédemment, la microglie prend son origine dans le sac vitellin. Chez les rongeurs, ces cellules progénitrices y apparaissent au jour embryonnaire 7 (E7) (Prinz et al., 2019). Elles migrent ensuite vers le cerveau par la circulation vasculaire d'une part (Ginhoux et al., 2010), mais aussi par les ventricules et les méninges d'autre part (Cuadros & Navascués, 1998 ; Thion & Garel, 2017). Cette migration s'opère à partir du jour embryonnaire 9 (E9) jusqu'à formation de la barrière hémato-encéphalique à E14 (Matcovitch-Natan et al., 2016). Chez la caille, la microglie initie la colonisation du cerveau à partir du E9 jusque E16, mais une petite quantité de microglie est déjà présente dans le cerveau avant E9 (Cuadros et al., 1993). Au cours du développement, ces cellules microgliales arrivent très tôt dans le cerveau. En effet, elles y sont déjà présentes quand les neurones et les cellules gliales commencent seulement à s'y

différencier (à E16). De plus, cette colonisation cérébrale précoce semble conservée chez les vertébrés étant donné qu'elle est également observée chez différentes espèces comme le poisson-zèbre, le poulet, le lapin, le rat, la caille (Alliot et al., 1999; K. Ashwell, 1989; K. W. S. Ashwell et al., 1989; Cuadros et al., 1993; Herbomel et al., 2001; Marin-Teva et al., 1998) ou encore l'humain, où ces cellules pré-microgliales atteignent également le cerveau via les méninges et les ventricules à partir de la 5<sup>ème</sup> semaine (Rezaie et al., 1999; Verney et al., 2010).

La microglie se renouvelle par auto-prolifération tout au long de la vie car une fois la barrière hémato-encéphalique (BHE) formée, il n'y a plus de migration de cellules souches sanguines possible (Tay et al., 2016). Cependant, dans des conditions pathologiques particulières comme un stress chronique ou une irradiation qui atteint la BHE, des cellules souches peuvent atteindre le tissu nerveux et intégrer la population de microglies (Lenz & Nelson, 2018). De plus, dans le cas de maladies neurodégénératives comme la sclérose en plaques et la maladie d'Alzheimer, des progéniteurs de la moelle osseuse sont également observés dans le cerveau et font partie de la population de microglie (Jung & Schwartz, 2012; Simard & Rivest, 2006). Néanmoins, le repeuplement microglial est encore un sujet de controverse et des études supplémentaires avec des technologies plus précises sont nécessaires.

#### 2.2.1. Les différents morphotypes

De sa migration à son développement dans le système nerveux central (SNC), la microglie présente plusieurs morphologies (Schwarz et al., 2012). Il y a 4 morphologies distinctes (*figure 1*). La première est la forme amiboïde. Sous cette configuration, la microglie dite précoce ne présente pas de bras de ramification et son corps cellulaire est rond et dense, ce qui lui permet d'être mobile et de sécréter une quantité importante de cytokines. C'est sous cette forme que la microglie migre et colonise le cerveau (Hammond et al., 2019a). Plus tard, elle change de configuration et son corps devient plus allongé (2<sup>ème</sup> morphotype). Enfin, la microglie développe ses bras de ramification qui sont d'abord courts et épais (3<sup>ème</sup> morphotype), pour finir par une ramification avec de nombreux bras longs et fins (4<sup>ème</sup> morphotype) (Schwarz et al., 2012).

#### 2.2.2. Hétérogénéité de la microglie

La microglie est une population de cellules dont la fonction varie énormément selon l'âge de l'individu, la région du cerveau dans laquelle elle se trouve. Une analyse de l'expression des gènes de la microglie au cours du temps a permis de la classer en 3 profils chez les rongeurs (Matcovitch-Natan et al., 2016).

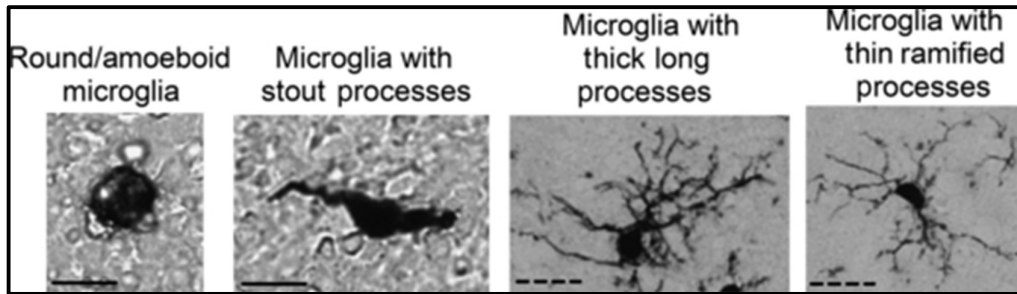


Le profil de la **microglie** dite **précoce** commence dès l'apparition de la microglie jusqu'à E14. Celle-ci est associée à l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la différenciation, comme MCM5 (composant 5 du complexe de maintenance des minichromosomes) et DAB2 (protéine adaptatrice 2).

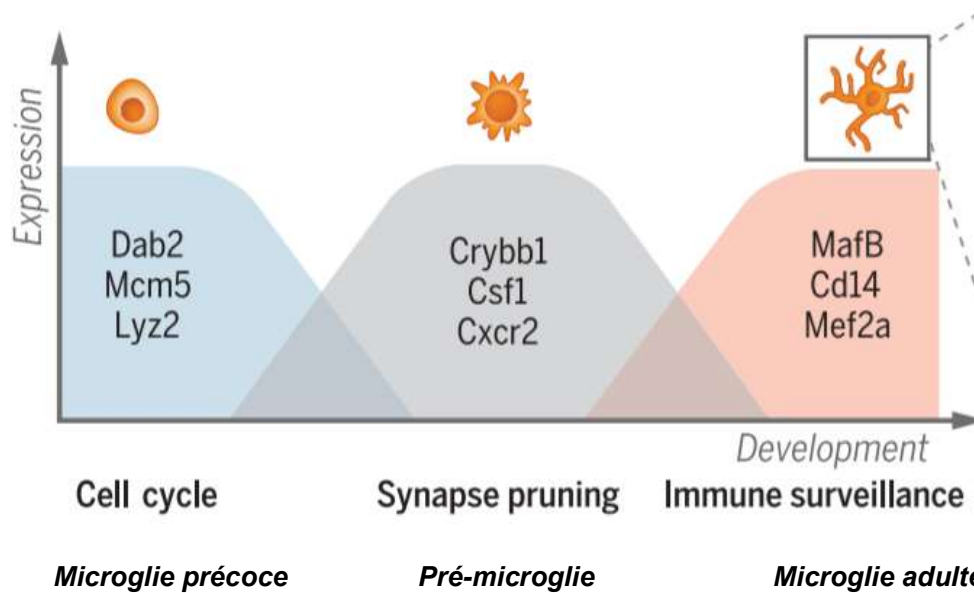
Ensuite, la **pré-microglie** apparaît de E14 jusqu'à quelques semaines après la naissance. Celle-ci est associée à l'expression de gènes comme CSF1R (récepteur du facteur 1 stimulant les colonies [CSF1], parfois appelé M-CSFR) qui est un récepteur membranaire à tyrosine kinase. Pour certains, CSF1R est exprimé par les microglies spécifiquement (Erblich et al., 2011), et pour d'autres il serait aussi exprimé faiblement par les progéniteurs neuronaux (Chitu et al., 2016). Dans tous les cas, il est indispensable pour le développement et le maintien de la microglie (Chitu & Stanley, 2017 ; Erblich et al., 2011 ; Elmore et al., 2014 ; Oosterhof et al., 2019).

Comme mentionné ci-dessus, CSF1R a pour ligand CSF1 aussi appelé M-CSF. Il s'agit d'un facteur de croissance nécessaire à la production, au développement, à la différenciation et la survie des macrophages et des monocytes (Greter et al., 2012). Contrairement à son récepteur, un déficit en CSF1 ne provoque pas de perte massive de microglie (Ginhoux et al., 2006). Cette observation laisse penser qu'un deuxième ligand serait responsable du maintien de la population de microglie. De fait, l'interleukine 34 (IL34) est le second ligand de CSF1R. Cette interleukine est produite presque entièrement par les neurones et les kératinocytes (Wang et al., 2012). L'IL34 est indispensable à l'homéostasie de la microglie (Greter et al., 2012; Wang et al., 2012; Wang & Colonna, 2014). Elle est exprimée dans le cerveau d'embryon de souris plus tôt que CSF1, et est détectable à partir du jour embryonnaire 11,5 (Wei et al., 2010). Ces deux ligands ne partagent pas le même domaine de liaison sur le récepteur et ne montrent pas d'homologie de séquence, ils ont donc des activités biologiques distinctes (Chihara et al., 2010). De plus, les deux ligands ne sont pas exprimés dans les mêmes régions du cerveau (Nandi et al., 2012). Ces données laissent penser qu'ils agissent en complémentarité.

Le dernier type de microglie est la **microglie adulte** qui apparaît quelques semaines après la naissance. Sous cette forme, la microglie est associée à l'expression de facteurs de transcription impliqués dans l'homéostasie de la microglie comme MafB (facteur de transcription B). La *figure 2* reprend l'ensemble des informations données ci-dessus (Matcovitch-Natan et al., 2016).



**Figure 1.** Représentation des 4 morphotypes de microglies. De gauche à droite : la microglie amiboïde, avec un corps cellulaire volumineux et pas de processus, la microglie à moyen processus, la microglie à processus épais, et la microglie ramifiée avec des processus longs et fins (Schwarz et al., 2012).



**Figure 2.** Représentations des différents transcriptomes de la microglie au cours de son développement chez le rongeur. De gauche à droite : la microglie précoce sous forme amiboïde qui exprime des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la pré-microglie qui exprime des gènes impliqués dans l'élagage synaptique, et la microglie adulte ramifiée qui exprime des gènes dans la surveillance immunitaire (Matcovitch-Natan et al., 2016).

### 2.2.3. Les rôles de la microglie dans le développement du cerveau

Grâce à sa capacité de phagocytose, la première fonction de la microglie consiste à éliminer les débris tels que les déchets apoptotiques (*fig. 3*) (Sierra et al., 2013). Ensuite, ses facultés mobile et sécrétoire lui permettent de se rendre sur un lieu de dommage du SNC et de sécréter des cytokines et chimiokines qui permettent de médier la réponse immunitaire (Kierdorf & Prinz, 2013). Elle exerce donc des rôles principaux de surveillance et de nettoyage, mais elle est également essentielle durant le développement pour d'autres tâches. En voici quelques exemples :

La microglie régule le nombre de progéniteurs neuronaux au cours du développement, et donc indirectement influence la neurogenèse (*fig. 3*). Le mécanisme de mort cellulaire programmée (ou apoptose) consiste à ne garder que les neurones les plus opérationnels. La moitié des neurones subit ce mécanisme au cours du développement et cela semble conservé parmi les vertébrés et les invertébrés (Abrams et al., 1993). Lors de sa colonisation dans le SNC, la microglie migre d'abord dans des zones de prolifération intense où elle phagocyte des progéniteurs neuronaux. Pour preuve, la désactivation de la microglie résulte en une augmentation de la population de progéniteurs neuronaux, et inversement, une activation de la microglie réduit ce pool (Cunningham et al., 2013). La figure 5. B. met en évidence une microglie avec des vésicules de phagocytose qui digère des progéniteurs neuronaux.

La microglie est également impliquée dans l'élagage synaptique (*fig. 3*). Le principe est approximativement le même que celui cité juste plus haut. La microglie phagocyte du matériel synaptique afin de sélectionner les synapses les moins efficaces pour permettre à celles restantes de continuer à se développer. Un retard d'élagage synaptique résulte en un excès d'épines dendritiques et des synapses immatures (Paolicelli et al., 2011; Schafer et al., 2012).

Une sous population de microglie exprimant CD11c est trouvée en abondance dans les zones de myélinisation primaire et est une source importante d'IGF1 (Insulin-like growth factor 1), un facteur de croissance nécessaire à la myélinogénèse et à la neurogénèse dans le développement. Une suppression sélective de l'expression d'IGF1 par les microglies CD11c réduit considérablement le poids du cerveau et significativement la myélinisation primaire, ce qui prouve l'implication de la microglie dans la myélinogénèse (*fig. 3*) (Wlodarczyk et al., 2017).

Enfin, la microglie joue aussi un rôle dans le câblage embryonnaire du cerveau antérieur en modulant l'excroissance des axones dopaminergiques et en positionnant les interneurons néocorticaux. Ce câblage embryonnaire impacte le développement de microcircuits néocorticaux postnataux (Squarzoni et al., 2014) et un dysfonctionnement de ce câblage peut être source de troubles neuropsychiatriques

(Marín, 2012). La microglie se développe dans le cerveau avec une localisation spécifique (Swinnen et al., 2013).

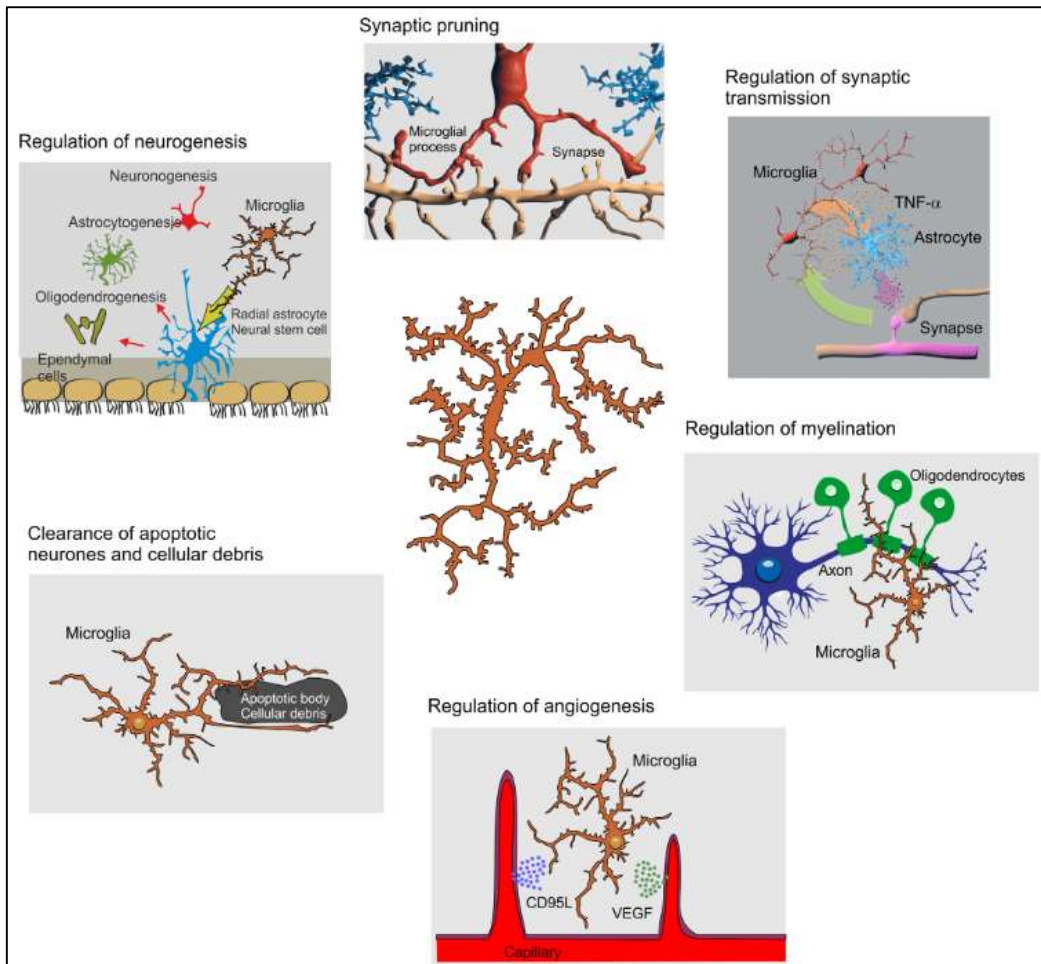
### 2.3. Rôle de la microglie adulte

La microglie adulte reste une population de cellules particulièrement dynamique. On la trouve sous deux formes différentes : la forme surveillante et la forme activée. Les figures 4 et 5A. montrent les principales fonctionnalités de la microglie ainsi que l'aspect histologique de ses deux formes adultes.

La **forme surveillante** présente une microglie avec un corps très allongé et de nombreux bras de ramifications qui sont longs et fins, ils permettent de maintenir l'homéostasie du cerveau en monitorant leur environnement (Davalos et al., 2005 ; Nimmerjahn et al., 2005). Le rôle de la microglie surveillante est de maintenir l'homéostasie cérébrale à l'aide de ses nombreux récepteurs pour les hormones (œstrogènes et progestérone), via les neurotransmetteurs, les cytokines et les chimiokines afin de répondre rapidement à la moindre perturbation (Kettenmann et al., 2011 ; Sierra et al., 2008). On distingue deux types de signaux qui contrôlent la capacité de phagocytose de la microglie, les signaux de type « mange-moi » et « ne me mange pas » (Hoek et al., 2000 ; Lehrman et al., 2018). Ces signaux sont captés par les récepteurs dits éboueurs, piégeurs ou scavengers en anglais (SR) et les PRR (Pattern Recognition Receptors) qui sont une grande famille de récepteurs des cellules de l'immunité innée (Herwald & Egesten, 2011; Hickman et al., 2018).

À l'inverse de la microglie surveillante, la **forme activée** est abondante lors d'un contexte inflammatoire, dû à un stress, une exposition à un pathogène ou un dommage. Il s'agit d'un état d'alerte qui permet de gérer une situation pathologique pour permettre le retour à la normale. Le morphotype de cette microglie activée est différent : les processus ont soit disparu soit sont beaucoup plus courts et épais, et le corps cellulaire s'hypertrophie. La microglie activée prolifère et présente une motilité et un profil sécrétoire de cytokines plus élevé, afin de réagir au danger (Kettenmann et al., 2013). Même si son aspect cellulaire rappelle la microglie amiboïde, ces deux types de microglies ne sont pas à confondre car elles n'exercent pas les mêmes activités (Lenz & Nelson, 2018).

Des informations supplémentaires sur les 2 formes de microglies adulte sont disponible en annexe.



**Figure 3.** Schéma illustrant les principales fonctions de la microglie pendant le développement. Au centre, une représentation d'une cellule microgliale ramifiée, avec autour les différents rôles qui sont : l'élagage synaptique, la régulation de la transmission synaptique, la régulation de la myélinisation, la régulation de l'angiogenèse, la clairance des neurones apoptotiques et des débris cellulaires, et la régulation de la neurogenèse (Augusto-Oliveira et al., 2022)

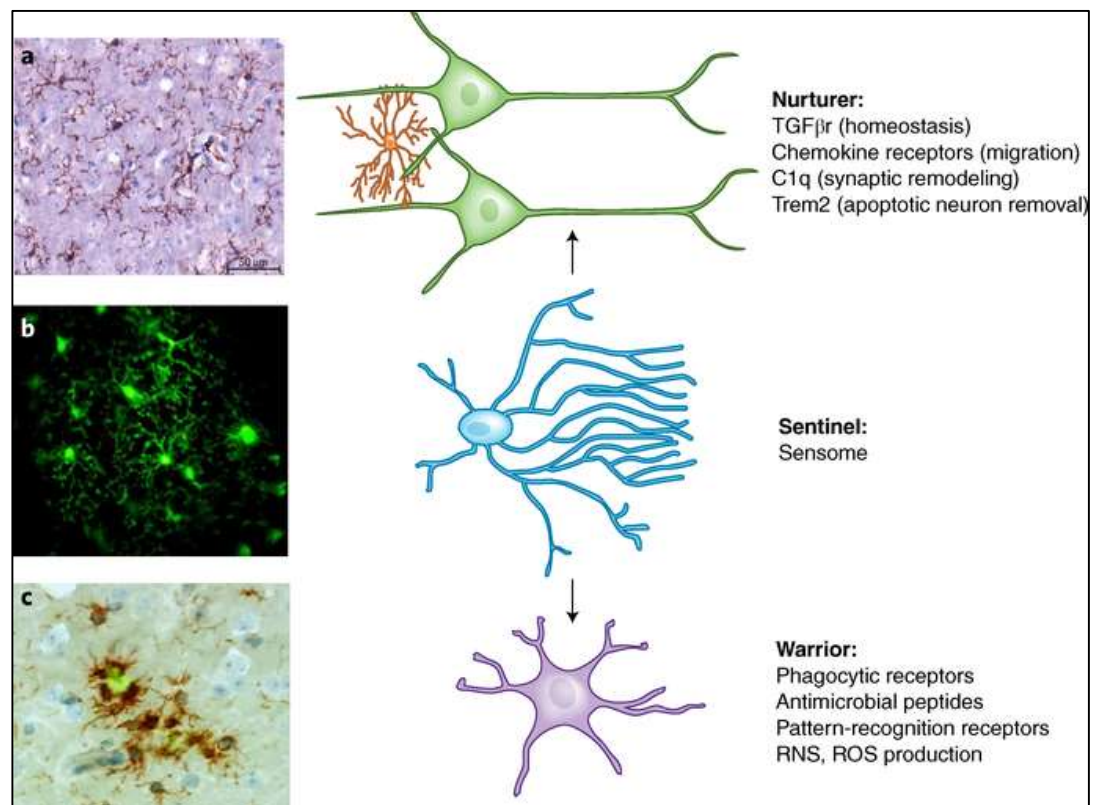
**Figure 4.** Les 3 principales fonctions de la microglie à l'âge adulte.

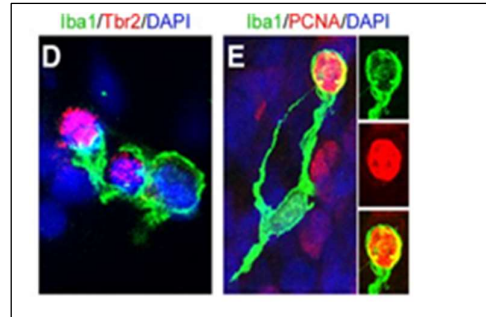
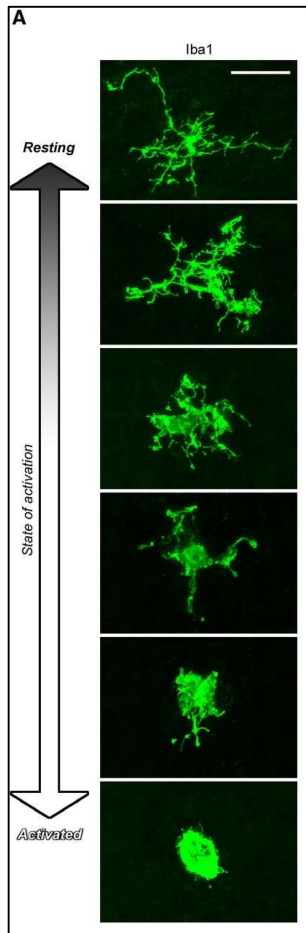
a. Etat nourricier, la microglie régulièrement espacée est colorée en marron.

b. Etat sentinelle, coloration d'une souris CX3CR1-GFP, l'image est tirée d'une vidéo qui montre que les processus microgliaux sont en constant mouvement.

c. Etat guerrier, la microglie, en marron, est plus abondante.

(Hickman et al., 2018)





**Figure 5. A.** Différentes morphologies de la microglie, de l'état de surveillance (« resting ») avec des processus fins et longs, à la forme activée (« activated ») sans processus et le corps cellulaire volumineux.

**D,E.** Microglie en train de phagocyter des progéniteurs neuronaux (Cunningham et al., 2013)

### 3. La différenciation sexuelle

#### 3.1. Les hormones stéroïdiennes

Les hormones sont des messagers chimiques. Elles sont produites par les cellules endocrines et sont libérées dans le sang ou la lymphe pour agir sur leur cible. Les hormones stéroïdiennes ont comme précurseurs communs le cholestérol (fig. 6) (Hiller-Sturmhöfel & Bartke, 1998). Elles jouent un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme et notamment des os, l'équilibre hydrique et salin, dans l'initiation et le maintien de la différenciation sexuelle et la reproduction. (Schiffer et al., 2019). On distingue plusieurs groupes en fonction du récepteur auxquels elles se lient : les glucocorticoïdes (cortisol), les minéralocorticoïdes (aldostérone), les androgènes (testostérone et dihydrotestostérone), les œstrogènes (estradiol) et les progestatifs (progestérone). Les hormones stéroïdiennes sont liposolubles. Cette caractéristique leur permet de traverser facilement une bicouche lipidique et par conséquent d'entrer dans une cellule ou traverser la BHE par simple diffusion (Beato, 2000).

##### 3.1.1. Les androgènes

Les androgènes sont associés aux hormones masculines car ils sont plus abondants chez les mâles. Dans ce groupe, on trouve la testostérone, la dihydrotestostérone (DHT) et la déhydroépiandrostérone (DHEA). Les androgènes sont impliqués dans de nombreuses fonctions comme la spermatogenèse, la différenciation et le maintien des caractéristiques primaires et secondaires mâles, le métabolisme, et le comportement agressif et copulatoire (Nelson, 2005).

##### 3.1.2. Les œstrogènes

Les œstrogènes sont généralement considérés comme les hormones sexuelles femelles car ils sont plus abondants chez celles-ci. Dans la famille des œstrogènes on trouve par exemple l'œstradiol, l'œstrone et l'œstriol, qui ont comme précurseur un androgène (fig. 6). Les œstrogènes sont produits principalement dans les ovaires, le placenta et enfin le cerveau. Leurs rôles sont multiples mais les principaux sont d'initier la formation du corps jaune, d'affecter de manière cyclique le tractus génital, et de maintenir les caractéristiques féminines secondaires (Nelson, 2005). Ils jouent également un rôle important dans le métabolisme et notamment celui de l'eau et du calcium, et empêchent la résorption osseuse (Khosla & Monroe, 2018). Enfin, ils régulent et influencent le comportement sexuel et maternel des femelles mais aussi le comportement sexuel, social et agressif des mâles. En plus de leur rôle protecteur sur la résorption osseuse, les œstrogènes jouent aussi un rôle protecteur sur le système

cardiovasculaire grâce à leur interaction avec le système immunitaire (Trenti et al., 2018).

Les œstrogènes ont deux modes d'action, un génomique et un non-génomique. Le premier induit des effets lents qui peuvent prendre quelques heures à quelques jours. La durée d'action est généralement longue (McEwen & Alves, 1999). Les œstrogènes rejoignent le noyau de la cellule et se fixent à des récepteurs nucléaires ER alpha et ER beta, qui agissent sur le promoteur de gènes cibles et modulent l'expression de ces gènes (Beato, 2000). Le mode d'action non-génomique implique des récepteurs membranaires qui, une fois lié à leur ligand, activent des voies de signalisations qui modifient l'activité de la cellule. Ces liaisons peuvent par exemple entraîner une modification de l'activité électrique ou de la sensibilité d'un récepteur pour son ligand. Ce mode d'action va de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes mais la durée d'effet est plus courte que celle des effets génomiques (Amenyogbe et al., 2020).

### 3.1.3. L'aromatisation

Comme illustré dans la figure 6, la testostérone est convertie en œstradiol par une enzyme nommée l'aromatase. L'aromatase est notamment exprimée dans les gonades, le placenta, les os et le cerveau (Santen et al., 2009). Chez les rongeurs, elle est exprimée en grande quantité dans l'amygdale médiane, l'hypothalamus médio basal, l'aire pré optique médiane et le noyau du lit de la strie terminale (BNST). En outre, elle est plus exprimée dans le cerveau des mâles que des femelles. Chez la caille, l'aromatase est active dans le cerveau à partir du jour embryonnaire 10 (Schumacher, Hutchison, et al., 1988)

### 3.2. La différenciation sexuelle chez les mammifères

La différenciation sexuelle est le processus par lequel un organisme ou un tissu devient mâle ou femelle et développe des caractéristiques spécifiques au sexe de l'individu. Ces caractéristiques s'établissent pendant le développement et garantissent la reproduction et le comportement de l'individu (VanRyzin et al., 2020). Le mâle, qui a un chromosome X et un chromosome Y possède sur ce dernier le gène Sry. Durant le développement embryonnaire, ce gène Sry initie une cascade de signalisations qui aboutit à la formation de testicules. La testostérone sécrétée par les testicules initie le développement des canaux de Wolff et la régression des canaux de Müller. Les femelles, elles, possèdent deux chromosomes X et développent deux ovaires en absence de la protéine (Testis Determining Factor) codée par le gène Sry. En l'absence d'androgènes, les canaux de Müller se développent en utérus, trompes et les canaux de Wolff disparaissent. Ainsi, la différenciation sexuelle femelle est la voie par défaut



(VanRyzin et al., 2020). Toutefois, une exposition périnatale à l'œstradiol semble nécessaire pour que la femelle montre les caractéristiques typiques femelles à l'âge adulte.

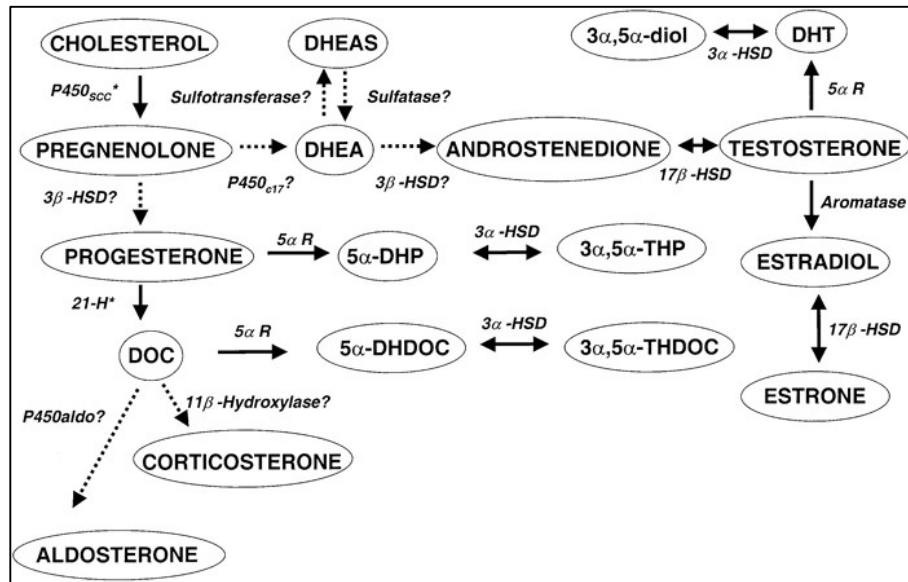
Chez le rongeur, la durée de gestation est d'environ 20 jours. Chez les mâles, un premier pic de testostérone issu des testicules nouvellement formés est observé entre E16 et E18. Un second pic est observé à la naissance (fig. 7). Après cela, les testicules ne sécrètent plus de testostérone jusqu'à la puberté (Bakker & Brock, 2010). Du côté des femelles, de l'œstradiol est sécrété à partir de la période post-natale (2 semaines).

### 3.2.1. La différenciation sexuelle du cerveau des rongeurs

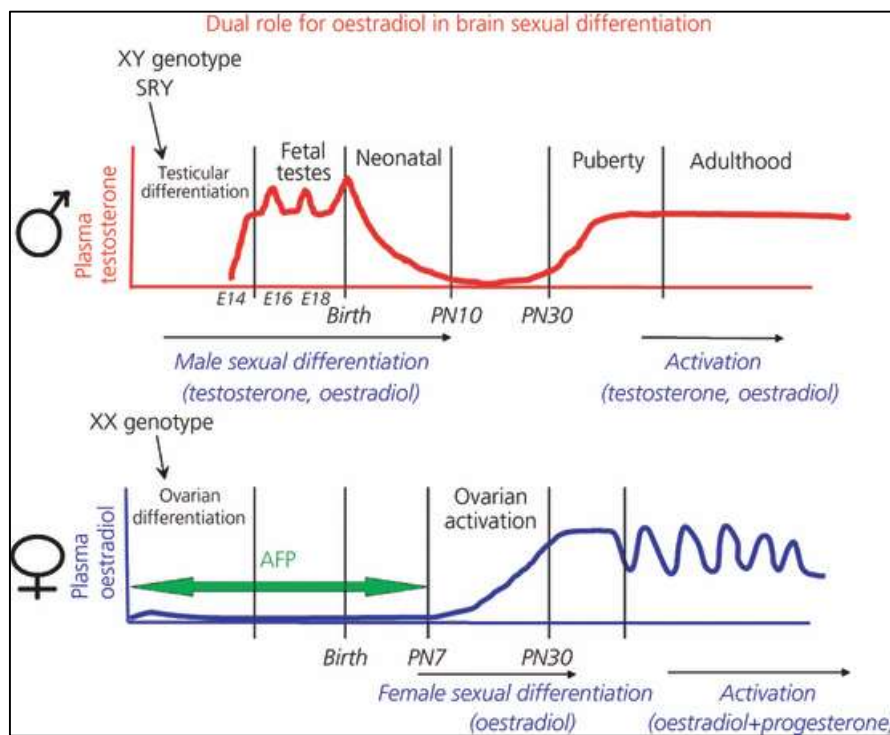
La différenciation sexuelle du cerveau dépend de l'exposition aux hormones sexuelles. Elle consiste à façonner la circuiterie du cerveau de manière irréversible et permet à l'individu une fois adulte de montrer les caractéristiques typiques à son sexe. Cette phase est appelée effet organisationnel (Phoenix et al., 1959). En effet, pendant la période embryonnaire (fig. 7) les androgènes testiculaires sont convertis en œstradiol par l'aromatase ce qui induit ensuite la masculinisation et la déféminisation du cerveau et du comportement (Schwarz & McCarthy, 2008). Chez les femelles, l'œstradiol sécrété un peu avant la puberté féminise le cerveau. L'œstradiol a donc deux effets clés mais opposés, selon la période de développement (Brock et al., 2011; Schulz & Sisk, 2006).

À partir de la puberté, les hormones sécrétées activent la machinerie, préalablement préparée, et permettent à l'individu d'exprimer un comportement sexuel et les caractéristiques typiques à son sexe (Phoenix et al., 1959). Toutefois, la phase d'activation peut être réversible si l'effet de l'hormone est inhibé. Alors que l'effet organisationnel qui agit pendant le développement embryonnaire est lui, irréversible. L'effet organisationnel se produit durant la période sensible aux stéroïdes. Il s'agit d'une fenêtre de temps durant le développement qui permet aux hormones stéroïdiennes de moduler l'architecture de cerveau. En dehors de cette période, les hormones n'exercent plus aucun effet sur l'architecture du cerveau.

De nombreuses expériences ont été réalisées en jouant avec cette période sensible. La première qui en fournit la preuve a été réalisée sur des cobayes et a montré que l'administration d'un androgène exogène avant la naissance avait la capacité de masculiniser le cerveau des femelles et leur comportement (Phoenix et al., 1959). A l'inverse, la castration des mâles dès la naissance empêche la masculinisation (Raisman & Field, 1973).



**Figure 6.** Voies biochimiques de la synthèse des neuro-stéroïdes dans le cerveau des vertébrés (STOFFEL-WAGNER, 2003).



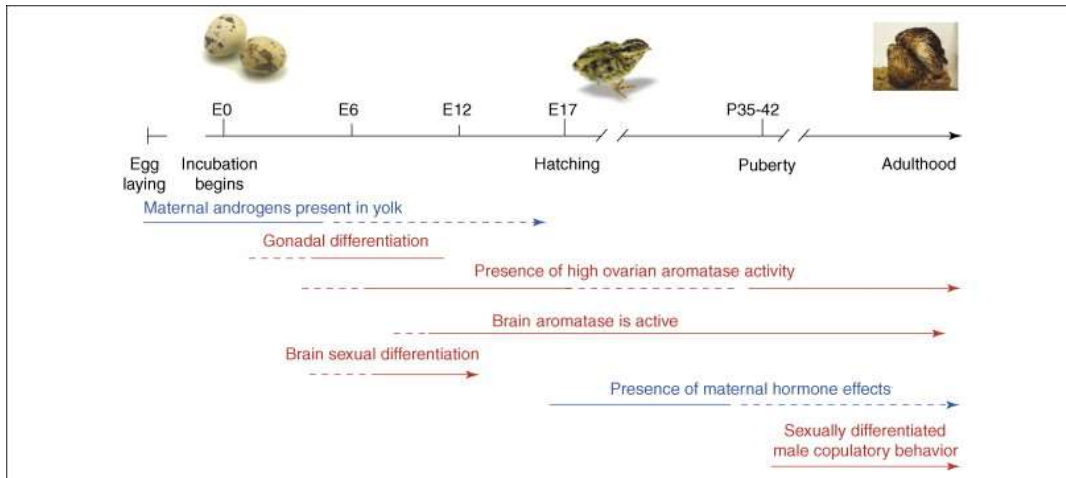
**Figure 7.** Schéma récapitulatif de la différenciation sexuelle du cerveau des rongeurs. Sous l'influence du sexe chromosomique, les gonades bipotentielles se différencient en ovaires ou testicules. Après quoi, les testicules sécrètent de la testostérone qui sera convertie en œstradiol dans le cerveau et permettra la différenciation sexuelle du cerveau, pendant la période sensible du mâle. Chez les femelles, la période sensible semble être plus tardive mais correspond aussi à une sécrétion d'œstradiol qui complète la féminisation. A la puberté, les hormones sont activatrices et permettent d'exprimer un comportement (Bakker & Brock, 2010)

### 3.2.2. La différenciation sexuelle du cerveau chez l'oiseau

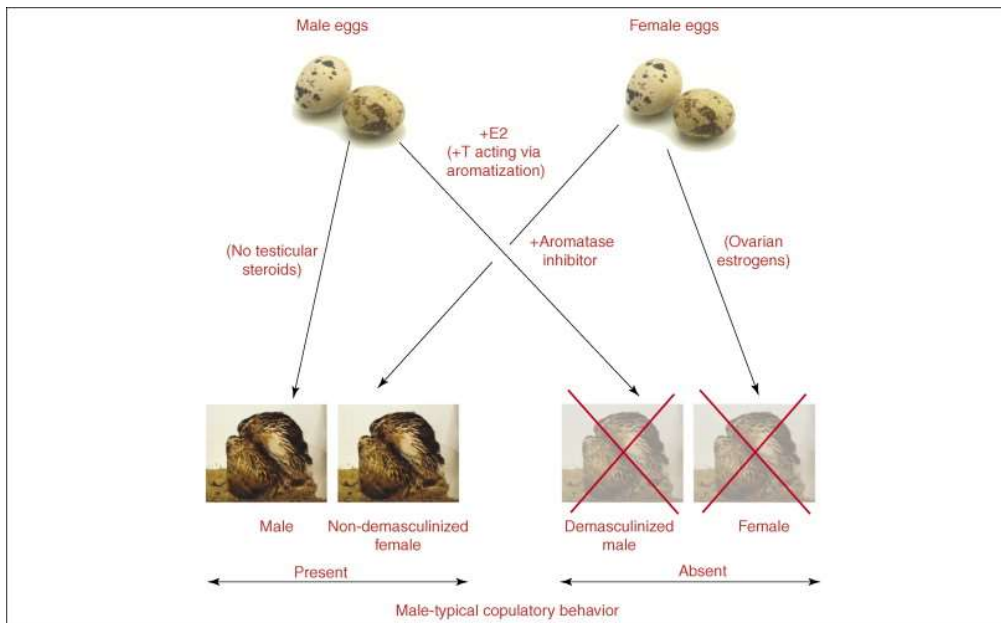
Chez l'oiseau, le sexe est déterminé par les chromosomes sexuels ZZ (mâle) et ZW (femelles) (Smith & Sinclair, 2004). Ce sont donc les femelles qui sont hétérogamétiques, en opposition aux mammifères. Les gènes portés par ces chromosomes ZZ & ZW contrôlent la différenciation sexuelle au cours de la vie embryonnaire. L'équivalent du *Sry* chez les mâles mammifères est le gène *DMRT1* chez l'oiseau qui est porté par le chromosome Z, il est le candidat le plus susceptible d'être responsable de la différenciation des gonades en testicules (Chue & Smith, 2011).

Comme chez les mammifères, une ébauche gonadique est présente chez les deux sexes. Chez les femelles, cependant, seul l'ovaire gauche devient mature alors que le droit régresse (Guioli et al., 2014). Durant le développement embryonnaire, l'ovaire produit de l'œstradiol à partir du 6<sup>ème</sup> embryonnaire (Ottinger et al., 2001). Par contre, les testicules restent relativement quiescents jusqu'à éclosion (Schumacher, Sulon, et al., 1988), un pic de testostérone survient à la naissance chez les mâles (Balthazart & Schumacher, 1984; Schumacher, Sulon, et al., 1988). Ensuite, il n'y a plus de production d'hormones jusqu'à la puberté chez les deux sexes (*jour postnatal 21*) (Ottinger & Brinkley, 1979).

Le même concept d'effets organisationnels et activateurs explique le développement des différences entre les sexes et les caractéristiques typiques du sexe à l'âge adulte. Toutefois, chez l'oiseau ce sont les mâles qui se développent en l'absence d'exposition à une hormone stéroïdienne sexuelle. Une hypothèse à cette inversion par rapport aux rongeurs est que le mâle oiseau est le sexe homogamétique ZZ comme la femelle rongeuse qui est XX. Chez la caille, la période sensible s'étend du 6<sup>ème</sup> jour au 12<sup>ème</sup> jour embryonnaire (fig. 8) et l'éclosion se produit vers le 17-18<sup>ème</sup> jour (Carere & Balthazart, 2007). Une injection d'œstradiol dans un œuf de caille mâle pendant la période sensible provoque la démasculinisation de son cerveau et de son comportement à l'âge adulte (fig. 9), et celui-ci ne peut montrer de comportement copulatoire typique mâle (Balthazart & Adkins-Regan, 2002). Il a été prouvé sur quatre espèces aviaires différentes (la caille japonaise (Adkins, 1979), le poulet (Sayag et al., 1991; Wilson & Glick, 1970), le pigeon (Orcutt, 1971) et le diamant mandarin (Adkins-Regan et al., 1994) que l'exposition précoce à l'œstradiol démasculinise le cerveau et le comportement des femelles (fig. 9) (Balthazart & Adkins-Regan, 2002), tout comme les rongeurs mâles.



**Figure 8.** Évolution des mécanismes endocriniens durant le développement de la caille japonaise. A partir du jour 4, les gonades se différencient en testicules ou en ovaires. Ce dernier une fois formé sécrète de l'œstradiol à partir du jour 6 qui démasculinise le cerveau et le comportement (=différenciation sexuelle du cerveau). En l'absence d'œstradiol sécrété par l'ovaire, le cerveau mâle se différencie. À partir du jour 10, l'aromatase est active dans le cerveau (Carere & Balthazart, 2007).



**Figure 9.** Représentation des manipulations qui ont permis d'identifier les mécanismes endocriniens qui contrôlent la différenciation sexuelle du cerveau et du comportement chez la caille japonaise. En l'absence d'exposition à un stéroïde sexuel pendant le développement, les mâles montrent un comportement copulatoire typique-mâle. Cependant, s'ils sont exposés pendant la période sensible à de l'œstradiol ou de la testostérone, ils ne montrent pas de comportement copulatoire typique-mâle. Les femelles non-manipulées ne montrent pas de comportement copulatoire typique-mâle à l'âge adulte. À l'inverse, si elles sont traitées avec un inhibiteur d'aromatase pendant le développement, elles montrent un comportement copulatoire typique-mâle suite à un traitement adulte avec de la testostérone (Carere & Balthazart, 2007)

Pour preuve, les embryons femelles qui reçoivent un traitement qui bloque l'œstradiol (ou un inhibiteur d'aromatase) pendant la période sensible montrent à l'âge adulte en réponse à de la testostérone exogène un comportement copulatoire typique mâle (fig. 9) (Adkins, 1976; Balthazart et al., 1992).

En résumé, la différenciation sexuelle du cerveau « par défaut » chez la caille est le phénotype masculin, contrairement aux rongeurs. De plus, une exposition pendant la période sensible à de l'œstradiol démasculinise le cerveau des oiseaux, alors qu'il déféminise le cerveau des rongeurs.

### 3.3. Les différences sexuelles dans le cerveau des rongeurs

La différenciation sexuelle du cerveau induite par les œstrogènes mène à des différences sexuelles comme le nombre et la morphologie de la microglie ou la taille du SDN dans l'aire pré-optique.

Tout d'abord, citons les différences qui concernent la microglie. Durant le développement, des différences de nombres et de morphologies ont été relevées, elles évoluent et s'inversent au cours du temps et jusqu'à l'âge adulte. En effet, durant la période sensible, les mâles possèdent un plus grand nombre de microglies amiboïdes (Lenz et al., 2012; Schwarz et al., 2012). Par la suite, à l'âge adulte, ce sont les femelles qui possèdent une densité de microglies plus élevée. Ces différences sont observées dans le gyrus denté, l'amygdale, l'hippocampe, le cortex pariétal (Schwarz et al., 2012) et dans l'aire pré-optique (POA) (Lenz et al., 2012). En parallèle, les femelles montrent un profil microgliale plus actif à partir de la naissance jusqu'à l'âge adulte par l'expression accrue des cytokines IL10 et IL1  $\beta$  (Lively et al., 2018; Schwarz et al., 2012). En résumé, les mâles possèdent une quantité de microglie sous forme amiboïde plus importante pendant la période sensible. Alors qu'à partir de la puberté, ce sont les femelles qui possèdent plus de microglie et plus réactive.

Dans le POA, deux noyaux sont sexuellement dimorphiques (Gorski et al., 1978) : le noyau sexuellement dimorphique de l'aire pré-optique (SDN-POA), qui est cinq fois plus grand chez le mâle. Cette différence s'explique notamment par un nombre plus important de neurones et une densité d'épines dendritiques qui les arborent plus importante chez les mâles. (Amateau & McCarthy, 2002, 2004). Le noyau périventriculaire antéro-ventral (AVPV) est lui plus volumineux chez la femelle (Orikasa et al., 2002). Notons que la zone du cerveau concernée par ces différences sexuelles sous l'action des hormones sexuelles est principalement le POA. En effet, cette zone exprime une quantité importante de récepteurs aux stéroïdes sexuels ainsi que d'aromatase (McCarthy, 2010), elle joue aussi un rôle clé dans le contrôle de la

reproduction et dans l'établissement du comportement reproducteur mâle et maternel (Hull & Dominguez, 2007 ; Lonstein & de Vries, 2000).

#### 3.4. Les différences sexuelles dans le cerveau des cailles

Comme pour le rongeur, le noyau pré-optique médian (POM) de la caille japonaise est significativement plus grand chez les mâles que chez les femelles (Viglietti-Panzica et al., 1986). Cette différence apparaît à la puberté vers cinq à six semaines de vie (Ottinger & Brinkley, 1979). Une autre différence sexuelle robuste concerne les neurones à vasotocine. La vasotocine est l'homologue de la vasopressine chez les mammifères (Panzica et al., 1996). Comme chez les rongeurs (Forger, 2006), les cailles mâles exhibent un plus grand nombre de fibres vasotocinergiques que les femelles dans le POM, le septum latéral (SL) et le noyau du lit de la strie terminale (BST) (Aste et al., 1998 ; Viglietti-Panzica et al., 1992, 1994).

Pour finir, des différences sexuelles existent également au niveau de la microglie chez la caille. Durant la période sensible, les femelles ont significativement plus de microglies dans le POM sous différents morphotypes (amiboïde et en transition) (Delage & Cornil, 2020). Cette différence est déterminée par les œstrogènes, puisqu'un traitement à l'œstradiol chez les mâles avant la période sensible augmente le nombre de microglie présentant alors un profil microgliale similaire à celui des femelles. À l'inverse chez les femelles, inhiber la synthèse des œstrogènes provoque un profil microglial semblable à celui des mâles. Ces données coïncident avec ce qui a été montré chez les rongeurs.

#### 3.5. Les mécanismes de la différenciation sexuelle du cerveau

Ces différences sexuelles sont induites par les hormones. Les mécanismes par lesquelles elles apparaissent sont : l'épigénétique avec l'acétylation et la méthylation des histones qui active l'expression d'un gène ou au contraire tait son expression, la neurogenèse et l'apoptose qui régulent le nombre de cellules, la spinogenèse et la migration neuronale et enfin la différenciation cellulaire (Lenz et al., 2012).

### 4. Implication du système immunitaire dans la différenciation sexuelle du cerveau et du comportement

La microglie et d'autres cellules du système immunitaire jouent un rôle dans la différenciation sexuelle du cerveau et du comportement. Même si ce rôle médiateur/acteur n'est pas encore tout à fait compris, les preuves sont limpides.

Tout d'abord rappelons que pendant le développement, la microglie participe à d'importants processus tels que la neurogenèse, l'angiogenèse, l'élagage synaptique et l'apoptose, ce qui lui permet de contrôler le nombre de cellules et de connexions (Augusto-Oliveira et al., 2022 ; Kettenmann et al., 2013). Ces rôles sont exécutés en partie grâce aux cytokines et aux prostaglandines que la microglie sécrète durant le développement sous sa forme amiboïde (Gehrmann et al., 1995). Toutefois, la microglie exprime également des récepteurs aux prostaglandines (Levi et al., 1998). La microglie a donc un double rôle de « produce & respond » vis-à-vis des prostaglandines. Les prostaglandines sont des hormones pro-inflammatoires qui sont synthétisées à partir de l'acide arachidonique grâce à deux cyclooxygénases, COX-1 et COX-2 (Ricciotti & FitzGerald, 2011). Les prostaglandines et plus particulièrement la prostaglandine E2 (PGE2), la plus abondante dans le corps, sont impliquées dans plusieurs processus notamment la régulation de l'inflammation. De manière intéressante, la microglie amiboïde produit également les COX-1 et -2 (Kaufmann et al., 1997). Cela dit, l'expression de COX-2 semble être induite de manière ponctuelle, à la suite d'un stimulus comme un contexte inflammatoire par exemple. Tandis que l'expression de COX-1 est, elle, continue (Garavito & DeWitt, 1999). A titre informatif, les COX sont les cibles des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (Ricciotti & FitzGerald, 2011).

#### 4.1. Activité sécrétoire des cellules immunitaires dans le contexte de la différenciation du cerveau

Dans le POA des rongeurs, la PGE2 participe à la masculinisation du cerveau. Au cours de la période sensible, l'œstradiol augmente la production de COX-2 et donc indirectement de PGE2, dont la concentration est plus importante chez les mâles. Celle-ci induit une augmentation du nombre d'épines dendritiques chez les mâles et est nécessaire pour la masculinisation du comportement (Amateau & McCarthy, 2004). Cette découverte a surpris la communauté scientifique, en effet il est interpellant de constater qu'une brève augmentation de PGE2 pendant le développement puisse façonner le cerveau de manière permanente (Wright & McCarthy, 2009). Plus récemment, il a été découvert que les mastocytes, qui sont présents en plus grande quantité dans le POA des mâles, via une dégranulation d'histamine induiraient une augmentation de PGE2, sous l'influence de l'œstradiol (Lenz et al., 2018).

Les sources de PGE2 et de COX-2 semblent être d'origine microgliale. En effet, la microglie est indispensable au processus de masculinisation puisqu'une inhibition de celle-ci empêche l'œstradiol d'augmenter le niveau de COX-2 et de PGE2 dans le POA en développement (Lenz et al., 2013). L'inhibition de la microglie pendant la période sensible empêche également la masculinisation du cerveau des mâles, ceux-ci ne

montrant plus le phénotype masculin des épines dendritiques, et étant incapables d'exprimer un comportement copulatoire mâles à l'âge adulte, même avec un traitement périnatal à l'œstradiol qui est normalement masculinisant (Lenz et al., 2013). Pour résumer, si la microglie est inactivée, les effets de la PGE2 sont inhibés. Cette étude a aussi mis en évidence qu'un traitement de PGE2 chez les femelles induit un profil microgliale similaire à celui des mâles, c'est-à-dire un nombre plus important de microglie amiboïde. À l'inverse, inhiber la PGE2 chez les mâles a empêché ces derniers de montrer un phénotype microgliale masculin. Ces données suggèrent donc un rôle central de la microglie et de la PGE2 dans la masculinisation du cerveau des rongeurs.

Chez la caille, on s'attendrait à ce que les effets soient juste inverses, étant donné que l'œstradiol démasculinise le cerveau des femelles. En effet, l'inhibition de la COX et donc de la PGE2 pendant la période sensible entraîne une diminution du comportement copulatoire mâle sans affecter l'innervation des neurones vasotocinergiques du POM (Delage et al., 2021). De plus, aucune différence entre les mâles et femelles n'a été relevée concernant la quantité de PGE2 ou d'acide arachidonique ainsi que des récepteurs aux prostaglandines dans l'aire pré-optique et l'hypothalamus (HPOA) (Delage et al., 2021). Une injection de PGE2 n'a pas réussi à masculiniser le cerveau des femelles. La PGE2 ne semble donc pas être autant impliquée dans la différenciation sexuelle du cerveau des cailles qu'elle ne l'est pour les rongeurs. Pendant la période sensible, l'inhibition de la COX augmente par contre le nombre de microglie chez les mâles au même niveau que les femelles tant pour la microglie amiboïde qu'en transition (Delage et al., 2021). En résumé, les effets de l'inhibition de la COX sur la microglie et les prostaglandines suggèrent qu'un prostanoïde dont l'identité reste actuellement inconnue serait impliqué dans le maintien de la masculinisation du cerveau des mâles, alors que chez le rongeur la PGE2 participe à la déféminisation et à la masculinisation du cerveau des mâles.

#### 4.2. Activité phagocytaire des cellules immunitaires dans le contexte de la différenciation du cerveau

Dans l'amygdale des rongeurs mâles, les microglies montrent une activité phagocytaire plus importante que les femelles pendant la période sensible. Cette phagocytose plus élevée est induite par les endocannabinoïdes et régule le nombre d'astrocytes façonnant la circuiterie neuronale. Il en résulte notamment une fréquence de jeux sociaux plus intense chez les mâles juvéniles par rapport aux femelles (VanRyzin et al., 2019). Inversement, dans l'hippocampe ce sont les femelles qui montrent une microglie néonatal phagocytaire plus élevée. Et l'œstradiol a pour effet de diminuer la



phagocytose dans les femelles (Nelson et al., 2017) . De plus, les femelles possèdent également une microglie phagocytaire plus importante dans le SDN en développement. Elles phagocytent majoritairement des neurones et cela explique la plus grande taille du SDN des mâles, une région impliquée dans la préférence de partenaire (McCarthy, unpublished data).

## 5. Justification de la caille japonaise comme modèle

Comme dit précédemment, la différenciation sexuelle du cerveau est en partie orchestrée par les stéroïdes sexuels. Durant le développement embryonnaire des rongeurs, les petits se développent dans le ventre de la mère et reçoivent les nutriments via le placenta. Ces derniers sont donc dépendants de l'environnement maternel. Si la mère est infectée par un agent pathogène, les petits subiront aussi la menace en plus de la réaction du système immunitaire de la mère. Cette exposition aux cytokines de la mère peut influencer le développement de la microglie et des neurones (Bilbo et al., 2018; Cloarec et al., 2016). Par conséquent, ces menaces peuvent affecter le développement des embryons et notamment la différenciation sexuelle du cerveau. L'importante implication de divers facteurs immunitaires (microglies, prostaglandines, mastocytes) dans le processus de différenciation suggère que toute perturbation de ces facteurs peut interférer avec le processus normal. L'avantage de travailler avec un modèle aviaire tel que la caille réside dans le fait que le développement se déroule dans un œuf, indépendamment de changements de l'environnement maternel. Enfin, la différenciation sexuelle du cerveau de la caille est connue et implique les mêmes hormones stéroïdiennes que pour le rongeur (Ball & Balthazart, 2010) .

Hypothèses,

Objectifs et

Stratégie

## 1. Hypothèses de travail

La première hypothèse de ce travail est que la microglie présente des différences d'abondance et d'activité entre les sexes au cours du développement.

La seconde hypothèse est que les hormones stéroïdiennes sexuelles telles que l'œstradiol sont les médiateurs de l'état de la microglie sexuellement différente.

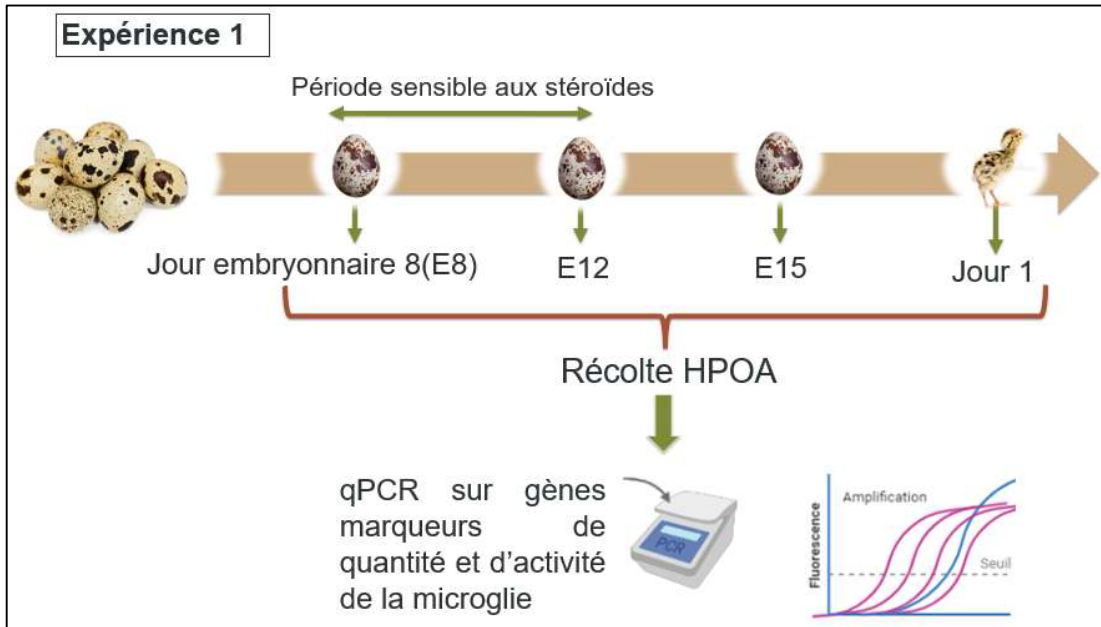
## 2. Objectifs poursuivis

Le but de ce mémoire est d'appuyer les résultats obtenus par notre laboratoire (Delage & Cornil, 2020) par une autre technique d'analyse. En effet, l'objectif est d'identifier des cibles qui vont nous renseigner sur l'activité et la densité de la microglie au cours du développement par qPCR. Si une différence est observée, ce que nous prévoyons sur base des résultats précédents du laboratoire, le second objectif sera de confirmer que l'œstradiol joue un rôle dans cette différence de microglie.

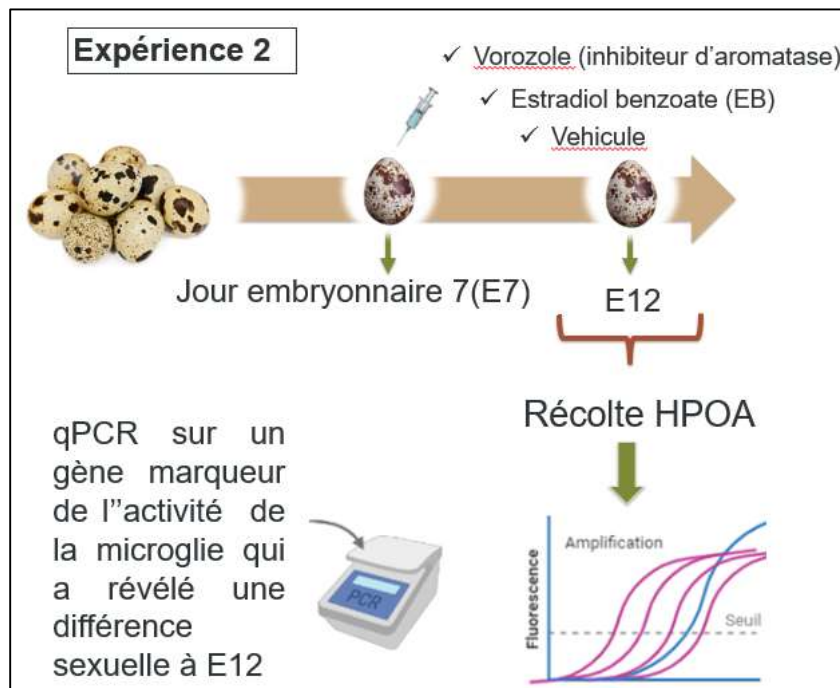
## 3. Stratégie expérimentale utilisée pour répondre aux objectifs

Pour répondre aux objectifs, une première expérience (fig. 10) a consisté à prélever l'hypothalamus et l'aire pré optique (HPOA) de 10 mâles et 10 femelles à différents jours de développement (8,12,15) jusqu'au premier jour de vie. Le jour embryonnaire 8 (E8) a été choisi spécifiquement puisque à ce moment la microglie n'a pas encore colonisé le cerveau, elle migre en masse à partir de E9 (Cuadros et al., 1997). E12 correspond à la fin de la période sensible (Carere & Balthazart, 2007), on s'attend à observer une différence reflétant une plus grande abondance de la microglie chez les femelles que chez les mâles à cet âge (Delage & Cornil, 2020). À E15, la période sensible est finie, il est censé ne rien se passer entre les mâles et les femelles et cet âge nous renseigne sur le type de microglie après la période sensible. Et enfin, lors du premier jour de vie (PN1), un pic de testostérone a été rapporté, il est donc intéressant de voir comment la microglie se comporte à ce moment (Balthazart & Schumacher, 1984; Schumacher, Sulon, et al., 1988). Ensuite, des qPCR ont mesuré l'expression de gènes marqueurs de quantité et d'activité de la microglie et ont permis de comparer les résultats entre les mâles et les femelles. Les gènes sélectionnés pour illustrer la quantité de microglies sont les gènes DAB2 et MCM5, des marqueurs de microglie précoce (Matcovitch-Natan et al., 2016), CSF1R, un marqueur de pré-microglie et son ligand IL34 (Matcovitch-Natan et al., 2016), RUNX-1, un marqueur général de microglie (Ginhoux et al., 2010). Les gènes qui mettent en évidence l'activité de la microglie sont les interleukines IL10 et IL1 $\beta$  qui sont sécrétés par la microglie (Crain et al., 2013; Turano et al., 2017).

La seconde expérience (fig. 11) a consisté à injecter au jour embryonnaire 7 soit un traitement à l'œstradiol soit un inhibiteur d'aromatase (le Vorozole), qui empêche la conversion de la testostérone en œstradiol, et de récolter le HPOA au jour embryonnaire 12. Le 12<sup>ème</sup> jour a été sélectionné puisque c'est à ce jour-là qu'une différence significative entre les mâles et les femelles a été révélée lors de l'expérience 1. Ensuite, des qPCR ont mesuré l'expression du gène IL1 $\beta$ . Ainsi, les différents traitements et leurs véhicules ont pu être comparés.



**Figure 10.** Schéma illustrant la stratégie expérimentale de l'expérience 1.



**Figure 11.** Schéma illustrant la stratégie expérimentale de l'expérience 2.

# Matériel et méthodes

# 1. Expérience 1

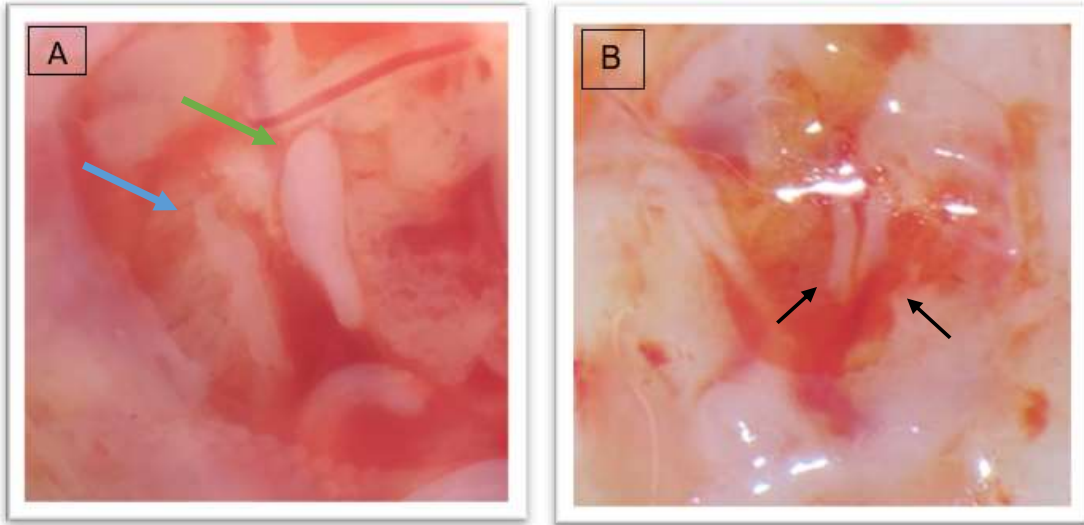
## 1.1. Animaux

Cette expérience a impliqué 83 embryons de cailles japonaises répartis en différents groupes en fonction de l'âge : 8<sup>ème</sup>, 12<sup>ème</sup>, 15<sup>ème</sup> jours embryonnaires et le 1<sup>er</sup> jour de vie (PN1). Les œufs fécondés, issus de l'animalerie du laboratoire de neuroendocrinologie, ont été incubés dans un incubateur (Ref. MG140/200, F.I.E.M.) maintenu à une température de 37,5°C et un taux d'humidité de 47%. Pour le groupe PN1, les œufs ont été placés dans des paniers d'éclosions au jour 15 d'incubation (sachant que l'éclosion intervient entre le 17<sup>ème</sup> et le 18<sup>ème</sup> jour d'incubation), et l'humidité a alors été augmentée à 60%. Cette expérience a été approuvée par le comité d'éthique animale de l'Université de Liège (protocole #1340) et est conforme aux lois belges concernant la protection des animaux de laboratoires.

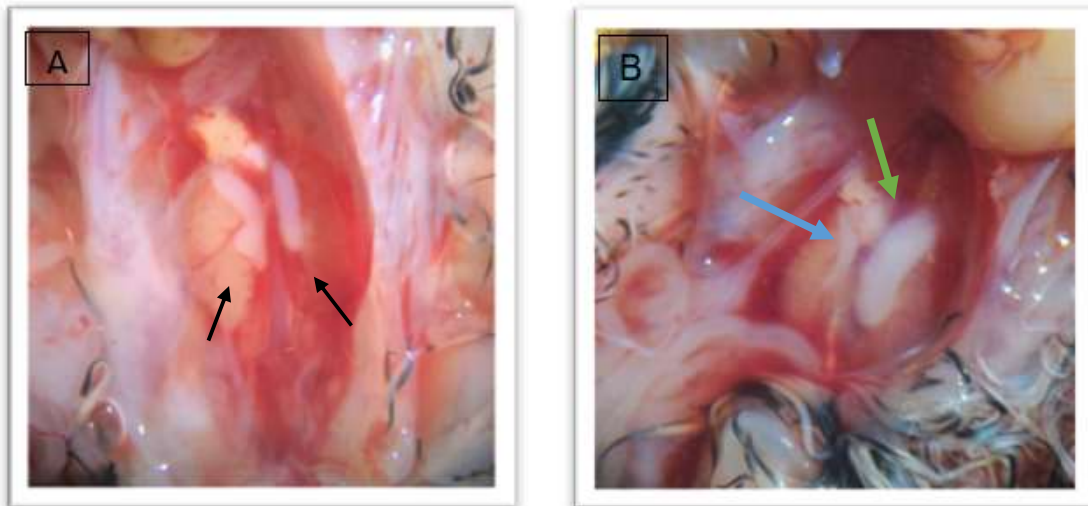
## 1.2. Collecte des échantillons

Afin de récolter le HPOA frais, les embryons ont été rapidement décapités. Ensuite, le sexe a été déterminé par observation directe des gonades au moyen d'un binoculaire après ouverture de la cavité abdominale. Chez la caille, le sexe est identifiable à partir du 8<sup>ème</sup> jour d'incubation (Intarapat & Satayalai, 2014). Les gonades sont situées entre le tube digestif et les reins. Chez le mâle, les testicules se distinguent par leur forme de grains de riz, alors que les femelles ne possèdent qu'un seul ovaire à gauche qui prend graduellement la forme d'une grappe de raisin (l'ovaire droit dégénère au cours de la différenciation de la gonade présomptive, il est encore visible mais de taille inférieure à l'ovaire gauche aux stades les plus précoces) (fig. 12-15). Le HPOA a été isolé par quatre incisions : une incision postérieure à la jonction entre le diencephale et le tronc cérébral, deux incisions latérales aux jonctions entre le diencephale et les lobes optiques, et une incision antérieure à la jonction entre le diencephale et le télencéphale (fig. 16-19). Un télencéphale et un bulbe olfactif ont aussi été collectés pour des analyses ultérieures et le sexage génétique si nécessaire.

Les échantillons ont été disséqués avec du matériel préalablement autoclavé et traité entre chaque dissection avec du RNase Away ou de l'isopropanol. La dissection du cerveau a été réalisée dans une boîte de pétri placée sur glace. Les échantillons ont été placés dans un tube Eppendorf taré et pesé avant d'être congelés sur carboglace. Les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

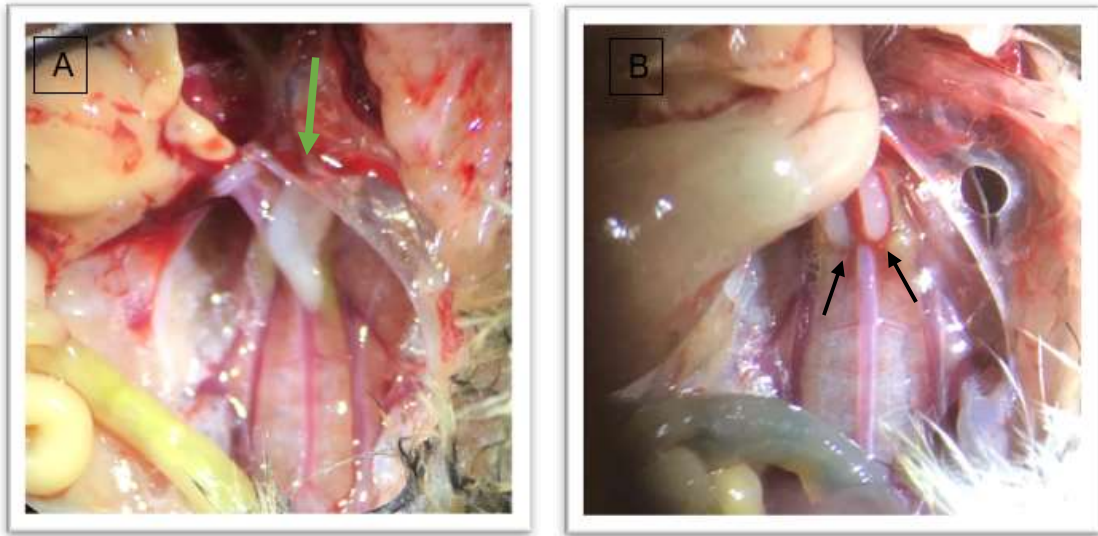


**Figure 12.** Gonades mâles et femelles au jour embryonnaire 8. Les gonades ont un aspect visqueux. **A.** Ovaire gauche femelle. La gonade droite (flèche bleue) est en train de se résorber pour laisser un seul ovaire gauche (flèche verte) qui produira les ovocytes. **B.** Gonades mâles. Deux gonades (flèches noires) de même taille et de mêmes couleurs.

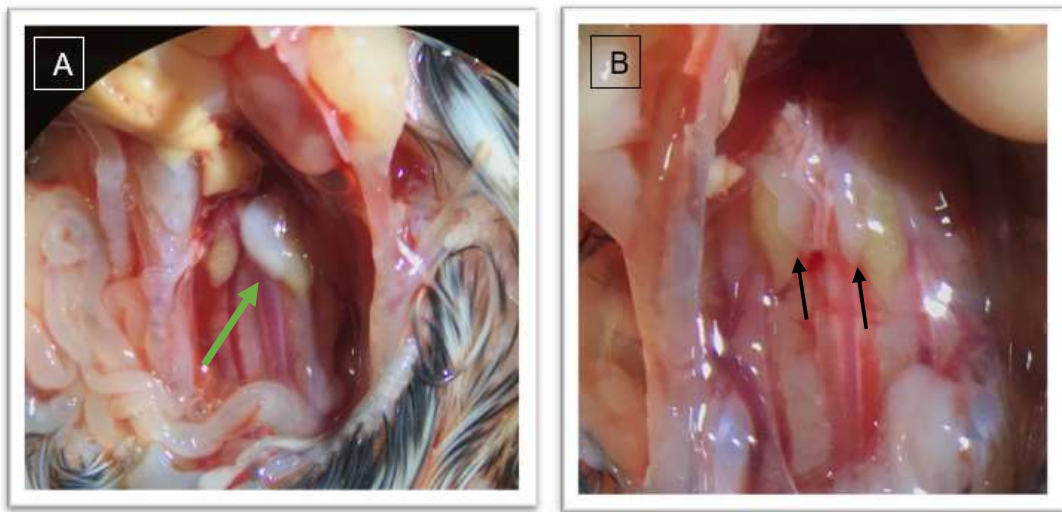


**Figure 13.** Gonades mâles et femelles au jour embryonnaire 12. **A.** Gonades mâles. Deux gonades (flèches noires) de même couleur apparaissent, elles sont plus blanchâtres en comparaison avec le jour 8. **B.** Gonades femelles. L'ovaire gauche (flèche verte) est plus gros. La gonade droite (flèche bleue) continue de se résorber mais apparaît toujours.

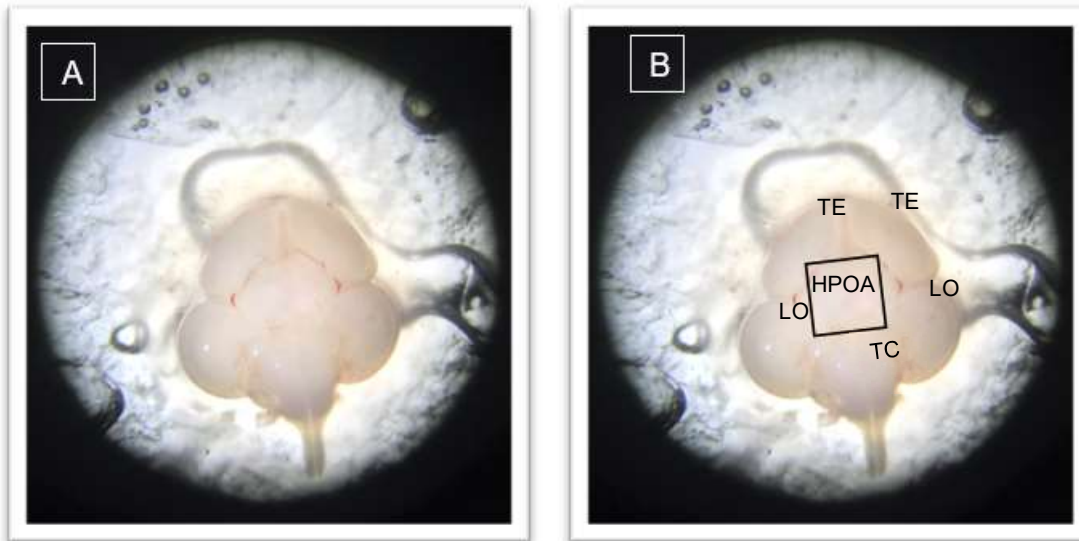




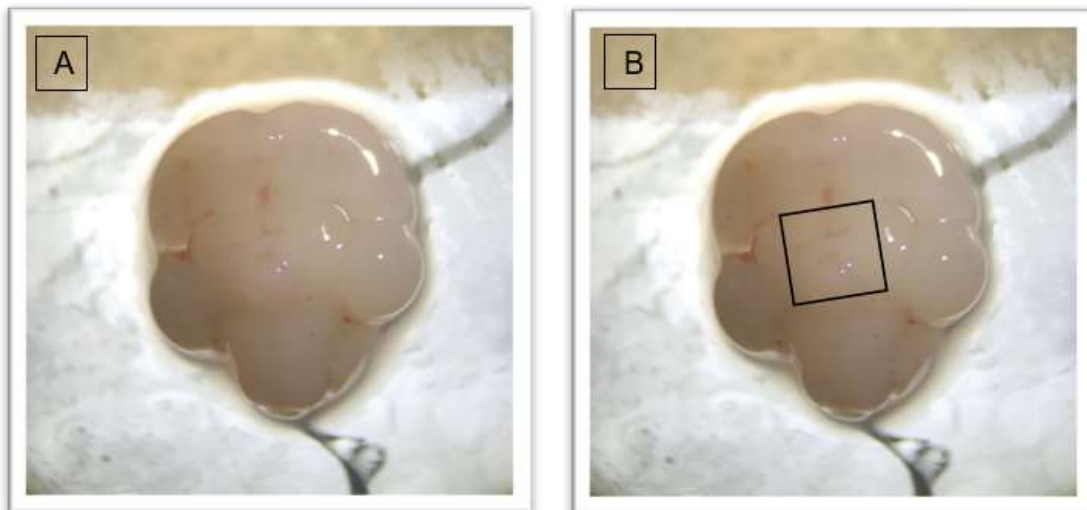
**Figure 14.** *Gonades mâles et femelles au jour embryonnaire 15. Au fur et à mesure du développement, les gonades deviennent des petites structures bien délimitées du reste du tissu. A. Ovaire. A ce stade, il n'y a plus qu'une seule gonade (flèche verte). B. Testicules. Deux gonades (flèches noires) toujours de même taille et symétrique. Sur cet individu on observe facilement que le tissu est moins visqueux et que les gonades sont plus visibles.*



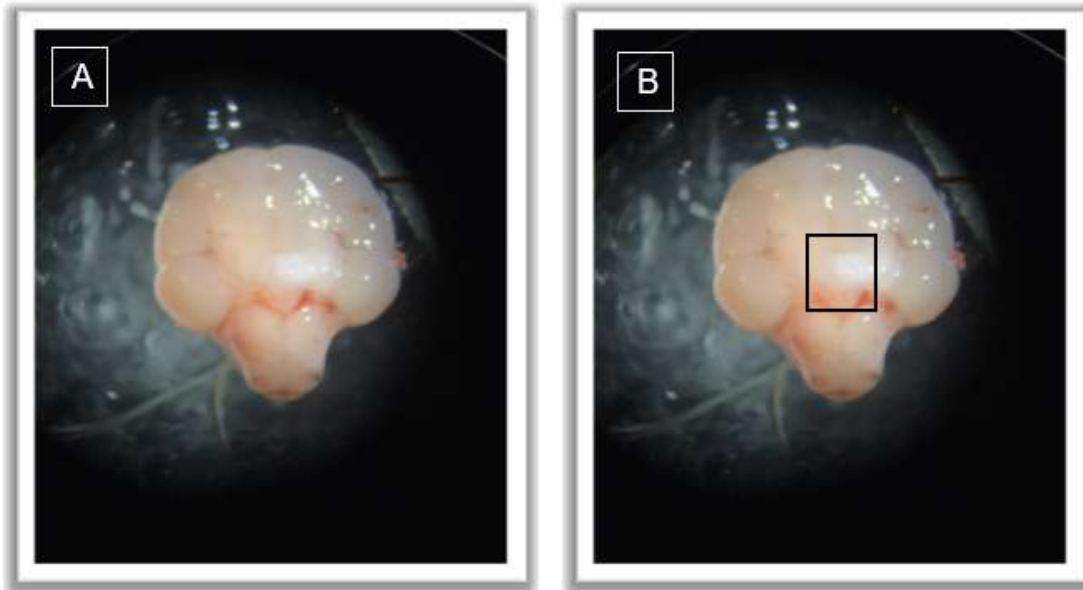
**Figure 15.** *Gonades mâles et femelles au jour postnatal 1. A. Ovaire (flèche verte). B. Testicules (flèche noire).*



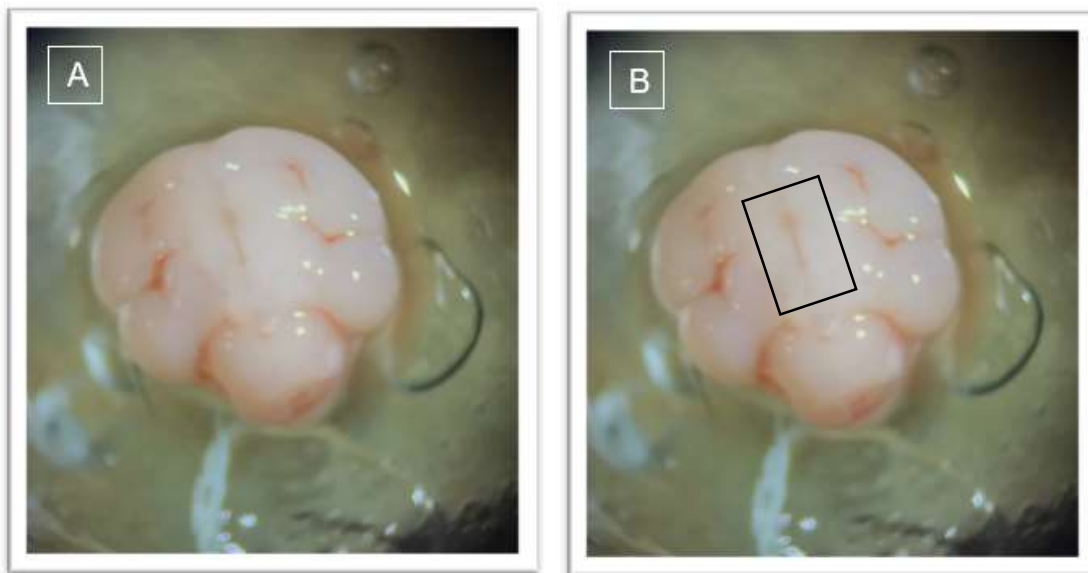
**Figure 16.** Photos d'un cerveau de caille au jour embryonnaire 8, obtenues grâce à un binoculaire. **A.** A ce stade de développement, le cerveau est extrêmement mou et visqueux. Sur les extrémités latérales, on observe les lobes optiques (LO), qui sont assez prédominants par rapport au reste du cerveau. Au milieu se trouve le HPOA, et au-dessus de celui-ci se trouvent les deux télencéphales (TE). En dessous du HPOA, il y a le tronc cérébral (TC). **B.** Les quatre incisions réalisées durant la dissection sont représentées par les lignes du carré noir, le HPOA correspond à l'intérieur du carré.



**Figure 17.** Photos d'un cerveau de caille au jour embryonnaire 12, obtenues grâce à un binoculaire. **A.** A ce stade, les lobes optiques paraissent moins gros par rapport au reste du cerveau, les télencéphales se sont développés et sont plus volumineux. Le tissu est moins mou qu'au jour 8, cependant il reste fragile avec un aspect visqueux. **B.** Même photo avec le carré noir qui correspond au HPOA.



**Figure 18.** Photos d'un cerveau de caille au jour embryonnaire 15, obtenues grâce à un binoculaire. **A.** Au jour 15, le tissu est plus ferme, les différentes régions sont plus facilement distinguables et mieux délimitées les unes des autres. Le chiasma optique est plus volumineux et myélinisé. Lors de la dissection, le chiasma a été délicatement retiré du mieux possible, cependant, un reste de celui-ci est observable (flèche orange). **B.** L'encadré noir correspond à la partie disséquée, à ce stade, les deux incisions latérales ont été réalisées à 1 mm de part et d'autre de la ligne médiane, la limite inférieure est l'éminence médiane (flèche jaune) qui est bien visible à ce stade.



**Figure 19.** Photos d'un cerveau de caille au 1<sup>er</sup> jour de vie, obtenues grâce à un binoculaire **A.** À ce stade, le cerveau est encore plus ferme qu'au précédent. La matière blanche (non visible sur la photo) est bien visible et crée une délimitation claire entre les lobes optiques et le HPOA. **B.** L'encadré noir correspond au HPOA, la région disséquée et récupérée

### 1.3. Recherche et validation des couples d'amorces pour les gènes d'intérêt

Pour réaliser une qPCR, il faut avant tout trouver un couple d'amorces qui s'hybrident sur le gène d'intérêt. Pour trouver les couples amorces de nos gènes d'intérêt, deux outils ont été utilisés. Le premier est la recherche dans la littérature via des articles scientifiques. Le second est l'option « primer blast » du site NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.com](http://www.ncbi.nlm.nih.com)) qui permet de déterminer plusieurs possibilités de couples d'amorces avec des localisations sur différents exons pour un gène et une espèce donnée. Ce logiciel indique également si le couple d'amorces peut s'hybrider sur d'autres gènes et amplifier une séquence non-spécifique. Peu d'informations étaient disponibles dans la littérature sur les gènes ciblés pour la caille et les quelques essais réalisés sur base de ces informations se sont révélés non-concluants. Nous avons donc procédé par essai et erreur en utilisant uniquement « NCBI primer blast » en visant des amplicons d'une taille maximale de 200 paires de bases et en privilégiant des amplicons chevauchant deux exons. La qualité des couples d'amorces a été déterminée sur base de la présence d'une seule courbe de fusion, signe de la spécificité des amorces, et d'une efficacité comprise entre 1.8 et 2.2. Pour certains gènes (SALL1, CX3CR1, IL6), nous n'avons malheureusement pas trouvé de paire d'amorces qui a pu être validée. Voici la liste des gènes étudiés et de leur d'amorces :

| Gène        | Nom   | Séquence 5'-3'  | Efficacité |
|-------------|---|---|------------|
| ACT         | Actine  | F : CAGCAAGCAGGAGTATGATGA<br>R : AAGGGTGTGGGTGTTGGTAA   | 1,8        |
| RPL32       | Protéine ribosomique L32  | F : ACCAAGAAGTTCATCCGCCAT<br>R : GAACCTCCTGCGAACTCTG    | 1,9        |
| PGK1        | Phosphoglycérate kinase 1                                       | F : CAAGCTCACCTGGACAAGT<br>R : GGACGGCTGCCTTGATTCTT     | 1,8        |
| GAPDH       | Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase                       | F : TCTCTGTTGTTGACCTGACCTG<br>R : ATGGCTGTCACCATTGAAGTC | 1,7        |
| DAB2        | Protéine adaptatrice 2  | F : CCGGGCACGCACAGA<br>R : CGTCTTTTCCACCCTCCGTT         | 1,9        |
| CSF1R       | Récepteur du facteur de stimulation des colonies de macrophages | F : CCTGGGGTGCAGAGAATAGG<br>R : AGGGGATGCTGAGCCTAAAGT   | 2,1        |
| IL34        | Interleukine 34   | F : GTACCAGCAGGTAGGGCTG<br>R : GAGTCCCACCGACAGTGTGT     | 1,8        |
| MCM5        | Composant 5 du complexe de maintenance des minichromosomes      | F : CGCGAAAAGTTGTTGGTGAGA<br>R : CAGTTGCGATTTCCGCACTT   | 1,8        |
| RUNX-1      | Facteur de transcription 1 lié au Runt                          | F : CGCGAACCCAGAAGACATCG<br>R : CAGGCGCTCTGAAAAGGACA    | 1,8        |
| IL10        | Interleukine 10   | F : CCAGCACCAGCCACCAG<br>R : CGTCGCATCGTCATCTTCAG       | 1,7        |
| IL1 $\beta$ | Interleukine 1 $\beta$  | F : AACATCGCTCTGTACCGTCC<br>R : CCACTCAGCACACACGACAT    | 2          |

**Table 1.** Amorces utilisées dans l'expérience 1 et 2.

#### 1.4. Extraction d'ARN

L'extraction d'ARN des échantillons a été réalisée grâce au kit « RNeasy Plus Mini Kit (250) » (Qiagen, 74136). Le tissu prélevé (HPOA) a été lysé à l'aide d'un tampon de lyse. Le lysat a été placé sur une colonne de silice sur laquelle l'ARN se fixe à l'aide de l'éthanol en combinaison avec un tampon à haute teneur en sel qui élimine l'ADN. Des lavages et un traitement supplémentaire à la DNase (Qiagen, 79254) ont été effectués. L'ARN a été élué avec 25 µl d'eau et mesuré au Nanodrop. Les rapports d'absorbance à 260/280 nm et 260/230 nm fournissent un indice sur la pureté de l'extraction. En sachant que les protéines absorbent à 280 nm et les sels et autres solvants à 230 nm, ces deux rapports donnent respectivement un indice de contaminations aux protéines et aux sels. Les 83 échantillons ont été extraits par 5, en veillant à mélanger les âges et le sexe dans le temps et par extraction. Les échantillons ont été stockés à -80°C jusqu'à la manipulation suivante.

#### 1.5. La Reverse Transcription

La reverse transcription a été réalisée grâce au kit « Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit » (Roche, 04897030001). Etant donné que les concentrations d'ARN étaient élevées, une première dilution a été réalisée en prélevant 2 µl d'ARN et 18µl d'eau, de manière à éviter de prélever une trop petite quantité d'ARN et donc le risque de ne pas pipeter assez d'ARN. Ensuite, les échantillons ont été dilués afin d'obtenir 500ng d'ARN dans un volume final de 12µl. 1 µl d'Oligo-DT a été ajouté afin de permettre l'hybridation sur la queue poly-A de l'ARNm pendant 10 minutes à 65°C. 7 µl de mix, composé principalement des bases (dNTP) et de l'enzyme de transcriptase inverse, a été ajouté pour un cycle de 1h à 50°C durant lequel l'enzyme synthétise un brin d'ADNc à partir de l'ARNm. Les 83 échantillons ont été transcrits par 16 et ici encore ils ont été mélangés entre les âges et le sexe. Au total, 5 reverse transcription (RT) ont été effectuées. Le volume final après la RT par échantillon était de 20µl. Les échantillons ont été stockés à -20°C jusqu'à la manipulation suivante.

#### 1.6. La qPCR en temps réel

Pour la qPCR, la première étape a été de préparer un pool d'ADNc nécessaire pour la gamme étalon. Pour ce faire, 3.5 µl de 4 échantillons pris au hasard pour chacune des 5 RT ont été sélectionnés et groupés pour obtenir 62.5 µl d'ADNc (20x 3.5µl). Ces 62.5 µl ont été dilués 8 fois avec de l'eau pour obtenir un volume final de 500µl, ceci était la première dilution de la gamme (D8). Ensuite, 250 µl de D8 ont été mélangés avec 250 µl d'eau et ont constitué la seconde dilution de la gamme, D16. Le volume final de chaque D était de 250 µl et correspondait à la quantité nécessaire pour remplir 11 plaques en tripliquât (+10%). Les dilutions suivantes ont été réalisées en mélangeant

à chaque fois la moitié d'eau et la moitié de la dilution précédente. La gamme étalon couvrait donc de D8, 16, 32, 64 et D128. Chaque dilution est répartie dans différents tubes Eppendorf® pour ne pas congeler/décongeler chaque jour le même tube et risquer de dégrader l'ADNc. Les 11 plaques ont été réalisées avec cette même dilution comme référence.

La seconde étape a été de diluer (10 fois) les produits de RT, pour avoir suffisamment d'ADNc pour les 11 gènes d'intérêt. Mais aussi car certains composants de la RT interfèrent avec la PCR si on ne les dilue pas. Etant donné que les 11 plaques des gènes d'intérêt et de référence ne sont pas réalisées la même semaine, 1 dilution par semaine est faite pour ne pas dégrader l'ADNc.

Enfin, avant de charger 4µl d'ADNc sur une plaque 384 puits, un mix a été préparé avec environ 85 % d'un agent colorant le SYBRGreen Master (Roche, 04913914001), 10 % du mix correspondait aux amorces sens et antisens et le reste (6%) était complété avec de l'eau. 6 µl de mix ont été chargés dans chaque puit. En résumé, sur la plaque il y avait les 83 échantillons en tripliquât ainsi que les différentes dilutions de la gamme étalon de D8 à D128 et un tripliquât de mix et d'eau. La plaque a été centrifugée 1 min à la vitesse max avant d'être déposée dans le LightCycler 480 (Thermo Fisher Scientific). Le thermocycleur effectue 40 cycles d'amplification durant lesquels le SYBRGreen s'intercale entre les bases d'ADN à chaque synthèse d'un nouveau brin. La fluorescence est mesurée et permet de donner une concentration relative.

#### 1.7. Méthode d'analyse et gènes de référence

Avant de commencer l'analyse, nous avons vérifié la « melt curve » ou courbe de fusion sur le programme afin de confirmer qu'il n'y avait qu'un seul produit amplifié. Cette étape est réalisée à la fin des 40 cycles. La température augmente par paliers de 0.1°C et la fluorescence est mesurée, cela donne un pic à la température de fusion. Si plusieurs pics sont observés, cela signifie que plusieurs produits différents, avec des longueurs différentes, ont été amplifiés. Nous avons ensuite vérifié l'efficacité de la réaction. Cette information est également fournie par le programme sur base de la pente de la droite obtenue en comparant les concentrations fictives et réelles des différentes dilutions de la gamme étalon. La pente de la droite doit être de -3.32, l'efficacité est calculée avec la pente de la droite de ce graphique et elle doit être aux alentours de 2 (tolérée de 1.8 à 2.2) ce qui correspond à l'amplification attendu entre deux cycles.

Les concentrations de chaque échantillon sont calculées par le programme sur base des concentrations fictives de la gamme étalon. Les concentrations sont alors

normalisées par la moyenne des valeurs obtenues pour les deux gènes de référence, l'actine (ACT) et RPL32 (un gène ribosomique).

Ces gènes de référence servent de contrôles puisqu'ils ne montrent pas d'évolution entre les différents jours de développement, ils servent également de contrôles à la RT. Enfin, la normalisation avec les gènes de référence permet de prendre en compte les variations de quantité d'ARN utilisé pour chaque réaction. Pour sélectionner les gènes de référence les plus stables entre les différents âges, quatre gènes de référence ont initialement été analysés et normalisés les uns sur les autres : PGK1, GAPDH, ACT et RPL32. Suite à cette analyse, ACT et RPL32 ont été retenus car ils ne varient pas entre les différents jours de développement.

Pour obtenir une concentration relative d'une qPCR, plusieurs méthodes sont possibles, les 2 premières sont basées sur les CT (cycle threshold). Le CT correspond aux nombres de cycles d'amplification nécessaires pour observer de la fluorescence. Il s'agit des méthodes delta-CT et 2 delta-CT. La troisième méthode est celle du programme du LightCycler, qui donne directement les concentrations grâce aux dilutions de la gamme. Pour les quatre gènes de référence, les deux méthodes ont été effectuées et les données ont été comparées avec les concentrations données par le LightCycler. La dernière méthode a été retenue pour analyser les gènes cibles, à savoir les concentrations données par le programme.

#### 1.8. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée sur GraphPad Prism 8.0.2. Des tests non paramétriques de Mann Whitney et Kruskal Wallis ont été réalisés pour comparer les échantillons selon le sexe et l'âge, respectivement, lorsque les conditions de normalité et d'homoscédasticité n'étaient pas respectées. Sinon, les données ont été analysées par une Anova 2. Pour les tests non paramétriques, une correction de Bonferroni a été appliquée en multipliant la valeur p obtenue pour chaque test par 6 pour prendre en compte les 6 tests effectués séparément (4 tests de Kruskal Wallis et 2 tests de Mann Whitney). Des analyses post-hoc de comparaisons multiples, test de Dunn pour le non paramétrique et méthode de Tukey pour l'Anova 2, ont été effectuées lorsqu'un résultat était significatif pour savoir à quel âge l'effet était observé. Le résultat est considéré comme significatif lorsque la valeur p est inférieure ou égale à 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## 2. Expérience 2

### 2.1. Animaux

Cette expérience a impliqué 84 embryons de cailles sacrifiées au 12<sup>ème</sup> jour embryonnaire. Les œufs fécondés ont été incubés dans les mêmes conditions que

l'expérience I. Au jour embryonnaire 7, les œufs ont été injectés avec un des trois traitements (voir ci-dessous). Cette expérience a été approuvée par le comité d'éthique animale de l'Université de Liège (protocole #1340) et est conforme aux lois belges concernant la protection des animaux de laboratoires.

## 2.2. Traitement *in ovo*

Le premier groupe a reçu une injection de 25 µg d'œstradiol benzoate (EB) dilué dans l'huile de sésame (500µg/ml ; E8515; Sigma-Aldrich). Le second a reçu une injection de 10 µg de Vorozole (VOR ; R76713, généreusement fourni par Dr R. DeCoster, Janssen research Foundation, Beerse, Belgique) dilué dans une solution 20% de propylène glycol en solution saline (200µg/ml). Les 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> groupes ont reçu respectivement une injection d'huile de sésame et une injection de propylène glycol à 20% en solution saline. Les deux solutions contenant de l'huile de sésame (groupe 1 et 3) ont été chauffées avant injection et les deux autres solutions (groupe 2 et 4) ont été filtrées à l'aide de filtres (Millex, SLGV033RS) afin de les stériliser. Les injections ont été effectuées à côté d'une flamme au moyen d'une aiguille de 25 gauges stérilisée à la flamme dans l'albumen après avoir pratiqué un trou dans la coquille à l'extrémité pointue de l'œuf. Les trous ont été refermés à l'aide de paraffine fondue.

## 2.3. Collecte des échantillons et biologie moléculaire

Les méthodes pour récolter les HPOA, en extraire l'ARN, le transformer en ADNc et la qPCR sont les mêmes que pour l'expérience 1.

## 2.4. Normalisation et analyse

La gamme étalon a été étendue de D2 à D128 (D2, D4, D8, D16, D32, D64, D128). La normalisation a été appliquée par la moyenne des deux gènes de référence, l'actine et RPL32.

## 2.5. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée sur GraphPad Prism 8.0.2. Des tests non paramétriques de Mann Whitney et Kruskal Wallis ont été réalisés pour analyser les échantillons selon le sexe et les différents traitements/contrôles, respectivement. Une correction de Bonferroni a été appliquée, la valeur p est multipliée par 4 et le résultat est considéré comme significatif lorsque la valeur p ajustée est inférieure ou égale à 5% ( $p \leq 0,05$ ). Une analyse post-hoc de comparaisons multiples (test de Dunn) a été effectuée lorsqu'un résultat est significatif pour savoir sur quel traitement l'effet était observé.



# Résultats

## 1. Expérience 1 : Evolution de l'expression des gènes spécifiques de la microglie et de leur activité au cours du développement embryonnaire chez les mâles et les femelles

### 1.1. Les gènes marqueurs de la quantité de microglie

#### 1.1.1. DAB 2

L'expression du gène DAB2 augmente au cours du temps comme le confirment les deux tests non paramétriques de Kruskal-Wallis comparant la quantité d'ARN présent en fonction de l'âge réalisés séparément chez les mâles ( $K= 28.99$ ,  $p < 0.0001$ ,  $p_{adj} < 0.0006$ ) et les femelles ( $K= 17.70$ ,  $p= 0.0005$ ,  $p_{adj} = 0.003$ ; fig. 20). L'analyse post-hoc a ensuite révélé que cet effet âge est expliqué par une concentration d'ARN significativement plus élevée chez les mâles à E15 ( $p= 0.0019$ ) et à PN1 ( $p < 0.0001$ ) par rapport aux mâles à E8. Les HPOAs collectés à PN1 expriment également plus DAB2 qu'à E12 ( $p=0.0094$ ).

Les HPOA femelles montrent aussi une concentration significativement plus élevée à E12 ( $p= 0.0470$ ), E15 ( $p= 0.0017$ ) et PN1 ( $p= 0.0019$ ) par rapport à E8. Les tests de Mann-Whitney réalisés entre les sexes à chaque âge n'ont pas montré de différence significative ( $p > 0.0473$ ,  $p_{ad} > 0.2838$ ).

#### 1.1.2. CSF1R

Bien que l'expression de CSF1R semble augmenter en fonction de l'âge, aucune différence significative n'a été révélée par les tests de Kruskal-Wallis réalisés séparément sur les deux sexes (males,  $K= 7.464$ ,  $p= 0.0585$ ,  $p_{adj} = 0.3500$  ; femelles,  $K= 9.689$ ,  $p = 0.0214$ ,  $p_{adj} = 0.1284$  ; fig. 20). Aucune différence sexuelle n'a été observée dans les tests de Mann-Whitney ( $p > 0.6842$ ,  $p_{adj} > 4.1052$ )

#### 1.1.3. IL-34

L'expression du gène IL34 montre le même profil que DAB2. Effectivement, les résultats des 2 tests non paramétriques de Kruskal-Wallis révèlent une différence significative pour les mâles ( $K= 36.73$ ,  $p < 0.0001$ ,  $p_{ad} < 0.0006$ ) et les femelles ( $K= 34.00$ ,  $p < 0.0001$ ,  $p_{ad} < 0.0006$  ; fig. 20). L'analyse post-hoc des données issues des mâles a montré que l'effet âge est dû à une concentration d'ARN significativement plus élevée chez les mâles à E15 ( $p= 0.0018$ ) et PN1 ( $p < 0.0001$ ) par rapport à E8, ainsi que chez les mâles à PN1 par rapport à ceux à E12 ( $p= 0.0020$ ). Les mêmes résultats ont été obtenus pour les femelles, avec une différence significative entre E8 et E15 ( $p= 0.0006$ ), E8 et PN1 ( $p < 0.0001$ ), et entre E12 et PN1 ( $p= 0.0074$ ). Des tests de Mann-

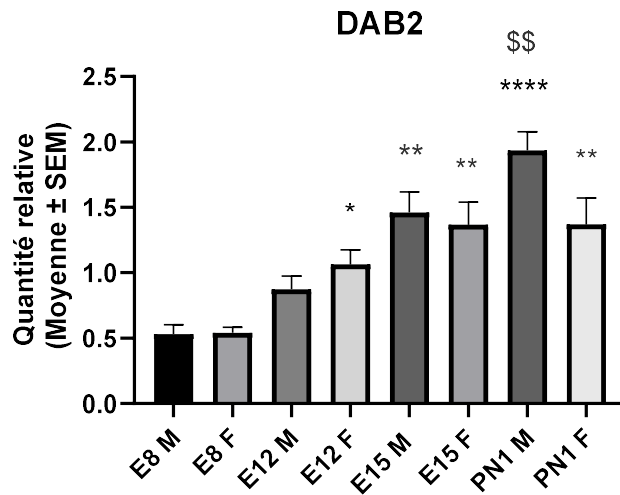
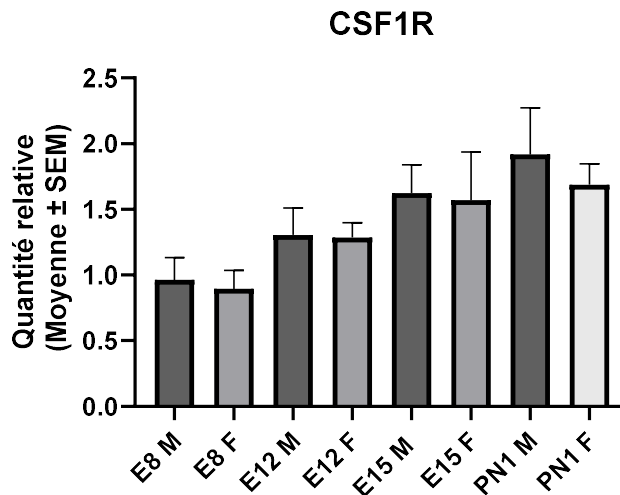
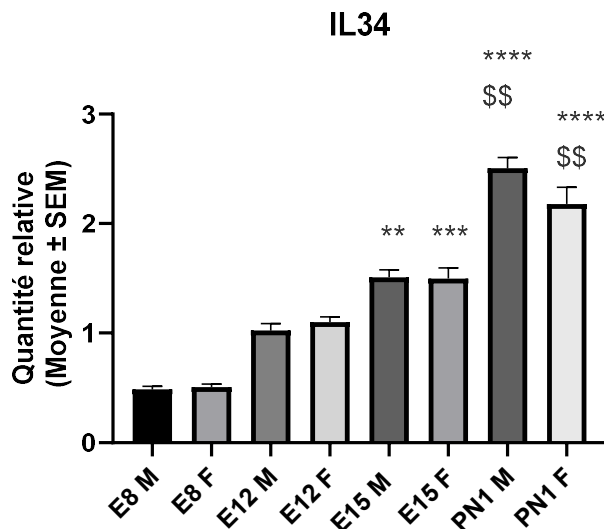
Whitney réalisés entre les sexes pour chaque âge n'a pas montré de différence significative ( $p > 0,2816$ ,  $p_{adj} > 1.6896$ )

#### 1.1.4. MCM5

L'expression de MCM5 augmente aussi au cours du temps. Etant donné que les conditions d'homoscédasticité et de normalité étaient réunies, une Anova 2 a été réalisée avec comme critères l'âge et le sexe. Un effet âge significatif a été relevé ( $F_{3,73} = 4.312$ ,  $p = 0.0074$  ; fig. 21), qui s'explique par une différence significative entre les groupes E8 et PN1 ( $p = 0.0051$ ). Par contre, aucune différence sexuelle n'a été observée ( $F_{1,73} = 1.795$ ,  $p = 0.1845$ ), pas plus qu'une interaction entre les deux facteurs ( $F_{3,73} = 2.684$ ,  $p = 0.0529$ )

#### 1.1.5. RUNX-1

L'expression de RUNX-1 montre le même profil que le gène MCM5. Ceci est confirmé par une Anova 2 qui montre un effet âge significatif ( $F_{3,75} = 8.853$ ,  $p < 0.0001$  ; fig.21) expliqué par des différences entre E8 et les autres âges (E12  $p = 0.0039$ , E15  $p = 0.0004$ , PN1  $p = 0.0002$ ). Aucune différence sexuelle n'a été observée ( $F_{1,75} = 4.952$ ,  $p = 0.0291$ ), pas plus qu'une interaction entre les deux facteurs ( $F_{3,75} = 1.152$ ,  $p = 0.3340$ ).

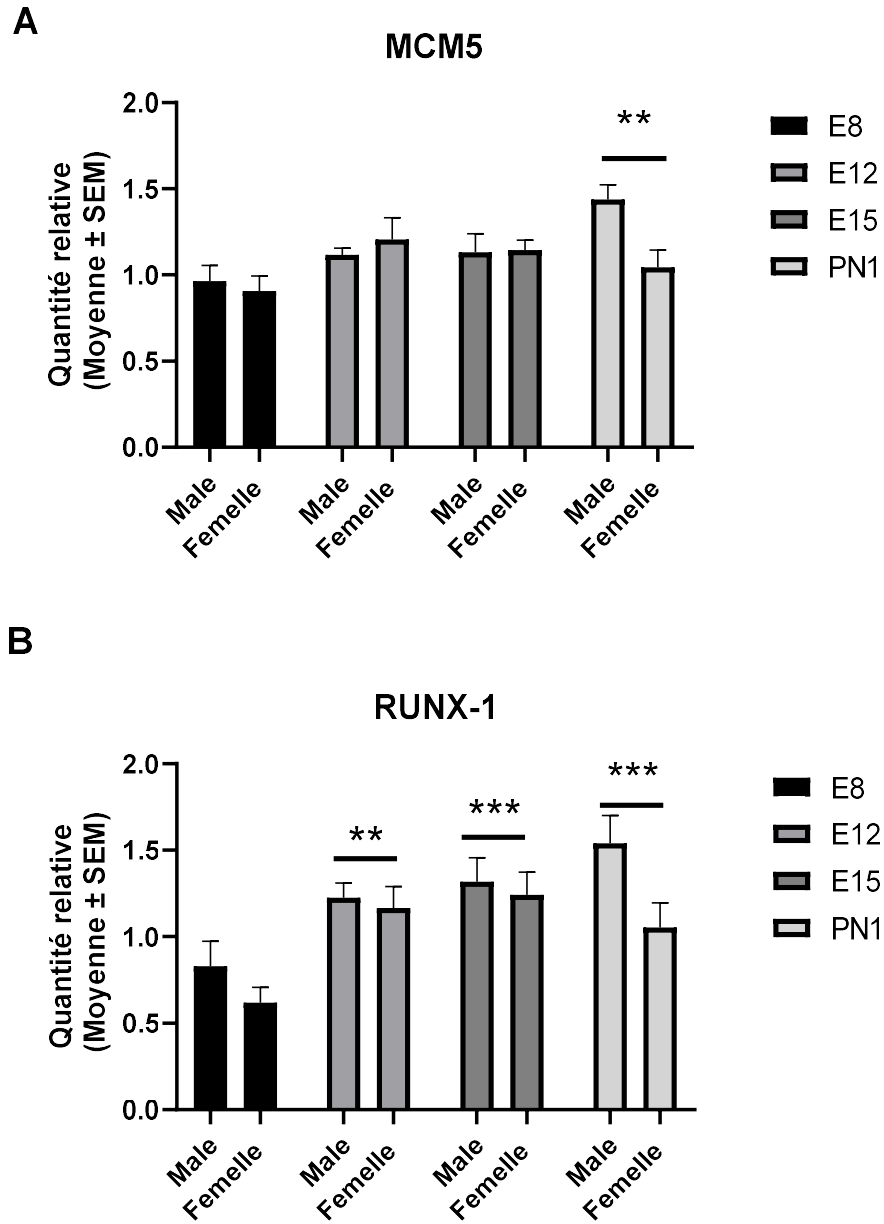
**A****B****C**

**Figure 20.** Expression relative de gènes marqueurs de quantité de microglie mesurées dans le HPOA aux jours embryonnaires 8,12,15 et au 1er jour de vie chez les mâles et les femelles.

**A.** Gène DAB2. **B.** Gène CSF1R. **C.** Gène de l'IL34.

**Abréviations :** E8 M : mâles au jour embryonnaire 8 (n=10), E8 F : femelles au jour embryonnaire 8 (n=10), E12 M : mâles au jour embryonnaire 12 (n=9), E12 F : femelles au jour embryonnaire 12 (n=10), E15 M : mâles au jour embryonnaire 15 (n=10), E15 F : femelles au jour embryonnaire 15 (n= 10), PN1 M : mâles au 1er jour post natal (n= 10), PN1 F : femelle au 1er jour post natal (n=10)

**Symboles :** \*, \*\*, \*\*\* et \*\*\*\* p < 0.05, 0.01, 0.001 et 0.0001 vs E8 chez le même sexe, \$ et \$\$ p < 0.05 et 0.01 vs E12 chez le même sexe



**Figure 21.** Expression relative de gènes marqueurs de quantité de microglie mesurée dans le HPOA aux jours embryonnaires 8, 12, 15 et au 1<sup>er</sup> jour de vie chez les mâles et les femelles. **A.** Gène MCM5. **B.** Gène RUNX-1. **Symboles :** \*\* et \*\*\*  $p < 0.01$  et  $0.001$  VS E8.

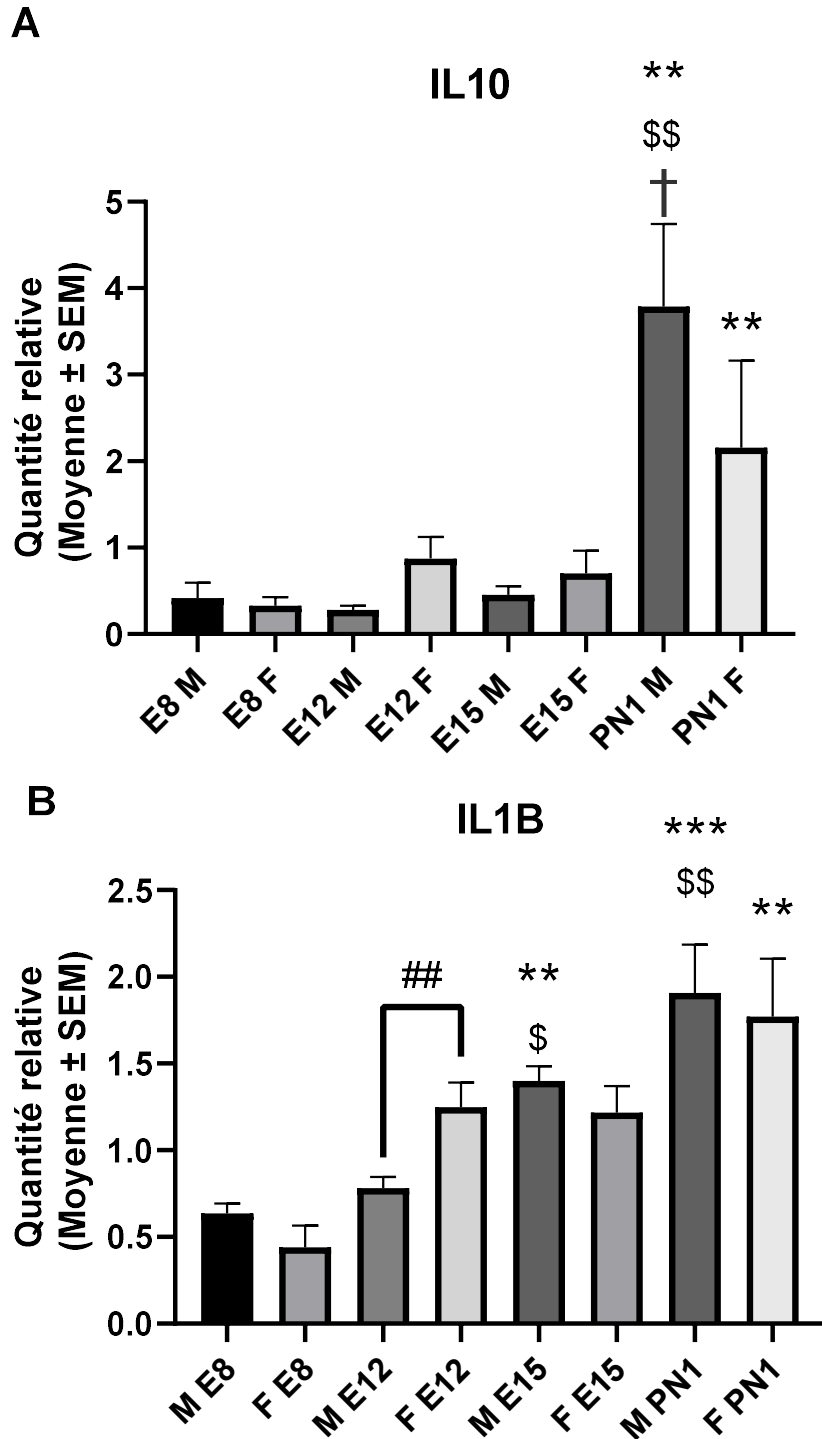
## 2.1. Les gènes marqueurs de l'activité microgliale

### 2.1.1. IL-10

L'expression du gène de l'interleukine 10 augmente au cours du temps et particulièrement à PN1 comme le confirment les deux tests non paramétriques de Kruskal-Wallis comparant la quantité d'ARN présent en fonction de l'âge réalisés séparément chez les mâles ( $K= 18.25$ ,  $p = 0.0004$ ,  $p_{ad}= 0.0024$ ) et les femelles ( $K=11.96$ ,  $p = 0.0075$ ,  $p_{ad}= 0.0450$  ; fig. 22). L'analyse post-hoc a ensuite révélé que cet effet âge est expliqué par une concentration d'ARN significativement plus élevée chez les mâles à PN1 par rapport aux mâles à E8 ( $p=0.0069$ ), E12 ( $p= 0.0040$ ) et E15 ( $p= 0.0166$ ). En revanche chez les femelles, seule une concentration d'ARN significativement plus élevée chez les femelles à PN1 par rapport aux femelles à E8 ( $p= 0.0052$ ) a été révélée. Des tests de Mann-Whitney ont été réalisés entre les sexes à chaque âge mais n'ont pas montré de différence significative ( $p > 0.1145$ ,  $p_{ad} > 0.6870$ )

### 2.1.2. IL-1 Beta

L'expression du gène de l'interleukine 10 augmente au cours du temps comme le confirment les deux tests non paramétriques de Kruskal-Wallis comparant la quantité d'ARN mesuré en fonction de l'âge réalisés séparément chez les mâles ( $K= 24.85$ ,  $p < 0.0001$ ,  $p_{ad} < 0.0006$ ) et les femelles ( $K= 12.49$ ,  $p = 0.0059$ ,  $p_{ad}= 0.0354$  ; fig. 22). L'analyse post-hoc a ensuite révélé que cet effet âge est expliqué par une concentration d'ARN significativement plus élevée chez les mâles à E15 ( $p= 0.0026$ ) et à PN1 ( $p= 0.0002$ ) par rapport aux mâles à E8, et chez les mâles à PN1 par rapport aux mâles à E12 ( $p= 0.0055$ ). En revanche chez les femelles, seule une concentration d'ARN significativement plus élevée chez les femelles à PN1 par rapport aux femelles à E8 ( $p= 0.0028$ ) a été observée. Des tests de Mann-Whitney ont été réalisés entre les sexes à chaque âge et mettent en évidence une différence significative à E12. En effet, à ce stade de développement, on observe chez les femelles une concentration d'ARN significativement plus élevée par rapport aux mâles ( $U= 12$  ;  $p= 0.0057$ ,  $p_{ad}= 0.0342$ ). Cependant, pour les autres âges aucune différence significative n'a été montrée ( $p > 0.0992$ ,  $p_{ad} > 0.5952$ ).



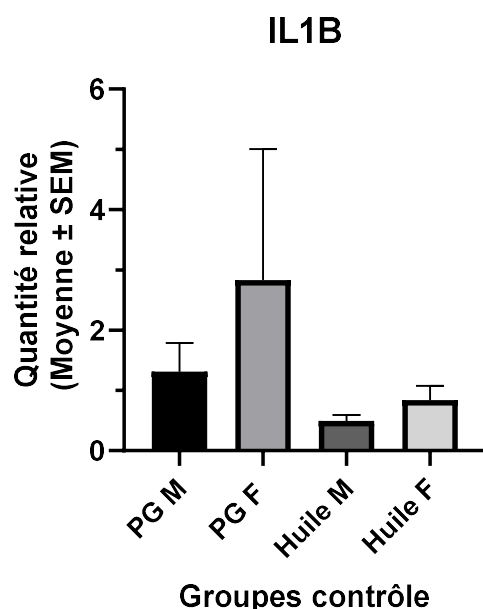
**Figure 22.** Expression relative de gènes marqueurs de l'activité de la microglie mesurée dans le HPOA aux jours embryonnaires 8,12,15 et au 1er jour de vie chez les mâles et les femelles. **A.** Gène IL10 **B.** Gène IL1 $\beta$ . **Symboles :** \*\* et \*\*\*  $p < 0.01$  et  $0.001$  vs E8 chez le même sexe, \$ et \$\$  $p < 0.05$  et  $0.01$  vs E12 chez le même sexe, †  $p < 0.05$  vs E15 chez le même sexe, ##  $p < 0.01$

## 2. Expérience 2 : Rôle des œstrogènes sur l'activité microgliale par l'expression d'IL1 $\beta$

Les résultats de la première expérience ont révélé une différence d'expression d'IL1 $\beta$  entre les mâles et les femelles à E12. Ces résultats suggèrent qu'au cours de la période sensible les mâles et femelles ont une activité microgliale différente, en faveur des femelles. Les œstrogènes sont les principaux médiateurs de la différenciation sexuelle du cerveau, et il a déjà été prouvé que l'œstradiol influence le profil microglial (Delage & Cornil, 2020). Afin d'appuyer ce postulat, des injections de Vorozole, un inhibiteur d'aromatase, ou d'œstradiol, ou leurs véhicules respectifs ont été réalisées dans des œufs au 7<sup>ème</sup> jour embryonnaire. Des qPCR ont ensuite mesuré l'expression du gène IL1 $\beta$  dans le HPOA d'embryons âgés de 12 jours et des comparaisons ont été réalisées entre les groupes ayant reçu différentes injections.

### 2.1. Comparaison des conditions contrôles

Il est nécessaire de comparer les groupes contrôles étant donné que les deux traitements ont été administrés dans un solvant différent. Bien que l'expression d'IL1 $\beta$  des femelles traitées avec le propylène glycol (PG, véhicule du vorozole) semble plus élevée que celle des femelles ayant reçu de l'huile de sésame (véhicule de l'œstradiol), un test de Mann-Whitney ne révèle pas de différence significative entre les deux traitements chez les femelles ( $U= 31.50$  ;  $p= 0.9807$  ; fig. 23). Le même résultat est obtenu pour les mâles ( $U= 15$  ;  $p= 0.1179$ ).

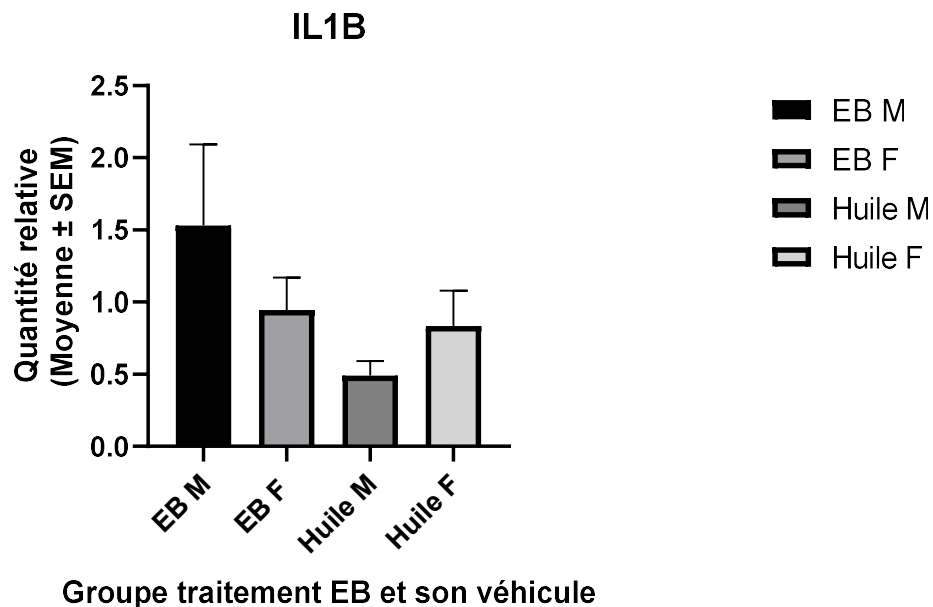




**Figure 23.** L'administration de 2 solutions contrôles, les véhicules des traitements testés, au jour embryonnaire 7 n'affectent pas l'expression de IL1 $\beta$  dans le HPOA au jour embryonnaire 12 chez les mâles et les femelles.

## 2.2. Effet d'une exposition précoce à l'œstradiol benzoate (EB)

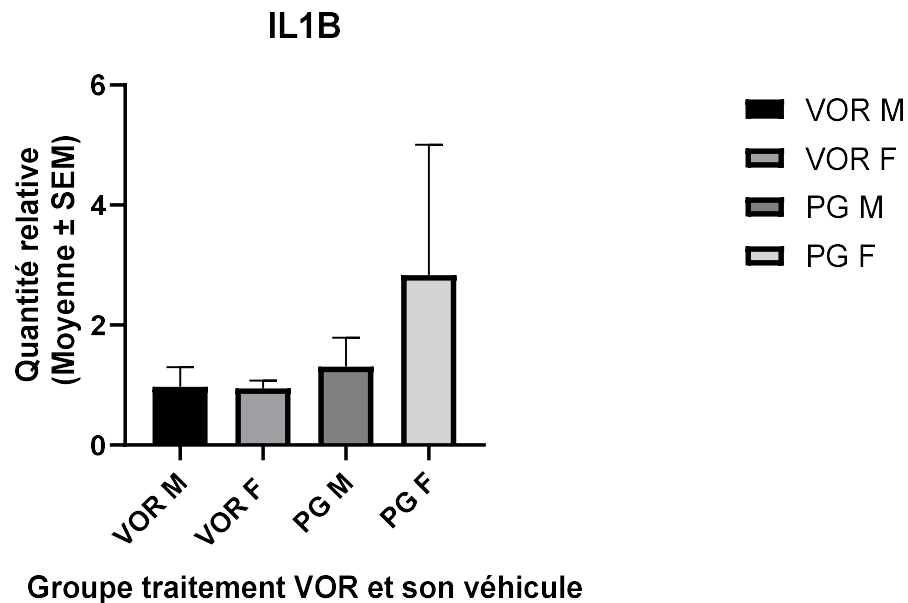
Chez les mâles, l'expression de l'IL1 $\beta$  semble augmenter à la suite d'un traitement à l'EB administré à E7. Cependant, des tests de Mann-Whitney comparant le groupe EB et son véhicule n'ont identifié aucune différence significative ni chez les mâles (U= 15.50, p= 0,0552) ni les femelles (U= 44.50, p= 0,8064 ; fig. 24). Aucune différence n'a également été observée entre les sexes au sein de chaque traitement (EB ; U= 53.50, p= 0,2978 ; Huile, U= 19, p= 0,5728), ne répliquant donc pas l'observation précédente d'une expression plus élevée chez les femelles.



**Figure 24.** L'administration d'œstradiol benzoate (EB) au jour embryonnaire 7 n'affecte pas l'expression d'IL1 $\beta$  dans le HPOA au jour embryonnaire 12 chez les mâles et les femelles.

### 2.3. Effet de l'inhibition précoce de la synthèse d'œstrogènes

Même si l'expression d'IL1 $\beta$  semble diminuer chez les femelles à la suite du traitement au Vorozole injecté à E7 par rapport aux femelles contrôles, le test de Mann-Whitney n'a mis en évidence aucune différence significative (U=38, p= 0.6443). Aucune différence significative du traitement n'a également été révélée chez les mâles (U= 42, p= 0.3867 ; fig. 25). Des tests de Mann-Whitney ont également été réalisés entre les mâles et les femelles pour le groupe Vorozole (U= 45 ; p= 0.3231) et le groupe véhicule (U= 36 ; p= 0,7618) mais aucune différence significative n'a été observée, ne répliquant pas la différence sexuelle initialement observée.



**Figure 25.** L'administration de Vorozole au jour embryonnaire 7 n'affecte pas l'expression d'IL1 $\beta$  dans le HPOA au jour embryonnaire 12 chez les mâles et les femelles.

# Discussion

Ce mémoire s'est intéressé au rôle de la microglie dans la différenciation sexuelle du cerveau de la caille japonaise. La différenciation sexuelle du cerveau se déroule au cours d'une période critique de sensibilité aux hormones. Chez les rongeurs, l'exposition à l'œstradiol lors de cette période sensible masculinise le POA des mâles en modulant notamment la microglie à la hausse et sous une configuration amiboïde (Lenz et al., 2013). Le modèle de caille japonaise, chez qui la différenciation sexuelle du cerveau dépend également des œstrogènes présente l'avantage que la période sensible est embryonnaire et que l'embryon se développe dans un œuf, en absence d'interactions avec la mère. Cependant à l'inverse des rongeurs, l'exposition précoce à l'œstradiol démasculinise le POM des cailles femelles. En parallèle, l'exposition précoce à l'œstradiol provoque l'augmentation du nombre de cellules microgliales chez les cailles femelles par rapport aux mâles pendant la période sensible.

L'objectif de ce mémoire était d'identifier des gènes marqueurs de la microglie et de leur activité afin d'en dresser le profil d'expression au cours du développement. Le second objectif visait à comprendre l'influence de l'œstradiol sur le profil microglial, cela a été réalisé en comparant l'expression d'un gène marqueur de l'activité microgliale durant la période sensible entre différents groupes ayant reçu soit du Vorozole, un inhibiteur de la synthèse des œstrogènes, soit de l'œstradiol, soit leur véhicule respectif. Les résultats de l'expérience 1 ont mis en évidence que la quantité de microglie augmente au cours du développement embryonnaire, sans suivre la classification (micrologie précoce/ pré microglie) établie pour les rongeurs (Matcovitch-Natan et al., 2016 ; Schwarz et al., 2012). Aucune différence d'expression des marqueurs de microglie n'a été relevée entre les mâles et les femelles aux différents jours embryonnaires. Par contre, une différence entre les sexes a pu être démontrée pour IL1 $\beta$ , un des deux marqueurs d'activité microgliale pendant la période sensible. Nous avons testé le rôle des œstrogènes embryonnaires dans cette différence dans l'expérience 2. Cependant, cette différence sexuelle n'a pas été répliquée. Par ailleurs, une injection précoce de Vorozole ou d'EB n'a pas eu d'effet sur l'expression de ce gène au cours de la période sensible. Enfin, les véhicules respectifs du Vorozole et de l'EB ne montrent pas les mêmes résultats, suggérant un effet activateur du propylène glycol, véhicule du Vorozole, sur l'activité microgliale.

## **1. La quantité de microglie évolue au cours du temps mais ne diffère pas entre les sexes**

Les résultats de l'expérience 1 suggèrent que la quantité de microglie augmente graduellement au cours du développement embryonnaire. L'expression des gènes DAB2, IL34, MCM5 et RUNX-1, qui sont supposés refléter la quantité de microglie, a augmenté au cours du développement embryonnaire (fig. 20-21). L'expression du gène RUNX-1, un

marqueur général de microglie (Ginhoux et al., 2010), augmente particulièrement entre E8 et les autres jours de développement (E12,15 et PN1). Ces résultats coïncident avec l'observation de la microglie qui colonise le cerveau entre E9 et E16 et qui s'y multiplie (Cuadros et al., 1997). Ces données suggèrent que les cibles choisies pour illustrer la quantité de microglie semblent être adéquates puisqu'elles sont cohérentes avec ce que l'on sait déjà.

En revanche, aucune différence de quantité de microglie entre les mâles et les femelles n'a été relevée au cours du développement. Ceci est surprenant puisque nos travaux précédents avaient montré que la microglie est plus abondante dans le POM des femelles pendant la période sensible (Delage & Cornil, 2020). Cependant, cette étude a été réalisée dans le POM spécifiquement, alors que notre expérience a été réalisée sur tout le HPOA (constitué de l'aire pré-optique et de l'hypothalamus), soit un volume beaucoup plus large que le POM seul. Si la différence mise en évidence dans le POM est spécifique à celui-ci, il est possible que cette différence ait été diluée dans le volume du HPOA. Cela expliquerait pourquoi aucune différence n'ait été observée dans le HPOA.

## 2. Le profil microglial des cailles n'est pas identique à celui des rongeurs au cours du développement

Chez les rongeurs, la **microglie précoce** est caractérisée par l'expression des gènes DAB2 et MCM5, des gènes impliqués dans le cycle et la différenciation cellulaire, au début du développement (de l'apparition de la microglie (E9) jusqu'au jour E14) (fig. 2). Elle est également caractérisée par une microglie de forme amiboïde. La **pré-microglie** apparaît de E14 à quelques semaines après la naissance, elle présente une morphologie en transition (microglie à processus courts et épais), et est caractérisée par l'expression du ligand CSF1 (Matcovitch-Natan et al., 2016 ; Schwarz et al., 2012).

Chez la caille, les résultats de l'expérience 1 montrent que l'expression de DAB2 (fig. 20) et MCM5 (fig.21) n'est pas limitée à la période de développement précoce. Au contraire, l'expression de DAB2 et dans une moindre mesure de MCM5 augmentent au cours du développement embryonnaire. Pour DAB2 en particulier, une importante augmentation de l'expression du gène se produit entre E8 et les autres jours de développement (E12,15 et PN1) et culmine à PN1.

Concernant le profil de la pré-microglie, le ligand CSF1 n'a malheureusement pas pu être analysé car aucun couple d'amorces n'a pu être validé. Le récepteur CSF1R et un autre ligand de ce récepteur IL34, ont en revanche pu être analysés. Le CSF1R (fig. 20) n'a pas montré de différence d'expression significative entre les différents jours embryonnaires et

le jour de naissance, malgré une très légère augmentation visible au cours du temps. Même si ce récepteur est indispensable au développement et au maintien de la microglie (Chitu & Stanley, 2017), ce résultat suggère que l'expression de ce récepteur n'augmente pas durant le développement embryonnaire. Il est cependant probable que le ligand, CSF1 ou IL34, augmente ou que l'affinité du récepteur pour le ligand augmente. IL34 est exprimée dans le cerveau des rongeurs à partir de E11.5 (Wei et al., 2010), et augmente graduellement jusqu'à la naissance (Greter et al., 2012). Nos observations montrent que l'expression de cette interleukine 34 augmente au cours du développement, ce qui correspond avec ce qui est observé dans le cerveau des rongeurs en développement et va dans le sens de l'hypothèse citée plus haut, à savoir, que la quantité de récepteur CSF1R n'augmente pas mais que la quantité de ligands, elle, augmente.

Les résultats obtenus montrent des divergences avec ce qui est observé chez le rongeur, puisque de la microglie précoce est encore présente dans le HPOA jusqu'au 1<sup>er</sup> jour de vie. Cela suggère que la microglie chez la caille ne suit pas la même classification (microglie précoce/pré-microglie) que celle décrite chez les rongeurs (Matcovitch-Natan et al., 2016 ; Schwarz et al., 2012).

### 3. L'expression d'IL1 $\beta$ de la microglie diffère entre les sexes au cours de la période sensible

L'activité de la microglie a été analysée via l'expression de deux interleukines, l'une anti-inflammatoire (IL10), l'autre pro-inflammatoire (IL1 $\beta$ ), et toutes deux sécrétées par la microglie (Crain et al., 2013; Ledebor et al., 2005; Turano et al., 2017). Dans le POA des rongeurs, les mâles présentent plus de microglie amiboïde au cours de la période périnatale (Lenz et al., 2013) et, pour rappel, cette forme de microglie sécrète une quantité plus importante de cytokines (Hammond et al., 2019b). A partir de deux mois après la naissance, par contre, ce sont les femelles qui présentent plus de microglie active (Lenz et al., 2013 ; Schwarz et al., 2012).

Chez la caille, le gène de l'IL10 montre une expression faible et constante au cours du développement embryonnaire (fig. 22). En revanche, au 1<sup>er</sup> jour de vie, son expression augmente de façon significative par rapport aux stades embryonnaires (E8,12,15), spécifiquement chez les mâles et non chez les femelles, suggérant une différence d'expression entre les sexes. Aussi, des différences apparentes d'expression en faveur des mâles à PN1 et en faveur des femelles à E12 ont retenu notre attention. Même si ces données ne sont pas significatives, elles sont en accord avec ce qui a été établi précédemment chez les rongeurs. En effet, les rongeurs mâles possèdent une microglie plus active pendant la période sensible alors que chez la caille ce sont les femelles à E12.

Après la période sensible, les femelles rongeurs à leur tour possèdent une microglie plus active, chez la caille cela correspond aux mâles à PN1 qui expriment plus IL10 que les femelles. Par ailleurs, la période sensible étant plus précoce chez les cailles que chez les rongeurs, si la microglie participe à la différenciation sexuelle du cerveau, il est vraisemblable que les mécanismes par lesquels elle le fait sont différents de ceux impliqués chez les rongeurs.

L'expression d'IL1 $\beta$  a évolué positivement aux cours du développement et révélé une différence d'expression entre les sexes en faveur des femelles (fig. 22). Cette différence est apparue au jour embryonnaire 12 ce qui correspond à la fin de la période sensible. Ce résultat concorde donc parfaitement avec notre hypothèse d'une différence d'activité à l'avantage des femelles. En effet, l'effet observé chez les cailles femelles est similaire à celui observé chez les rongeurs mâles au cours de leur période sensible respective. Cela suggère que les rongeurs mâles et les cailles femelles, qui sont exposés à l'œstradiol durant la période sensible, montrent des caractéristiques microgliales similaires, et donc que l'œstradiol pourrait influencer l'activité de la microglie. Une autre hypothèse serait qu'il existe simplement une différence de timing dans la maturation des microglies mâles et femelles, mais que leur fonction n'est pas différente et que la plus grande synthèse d'IL1 $\beta$  n'a pas d'impact sur la différenciation sexuelle du cerveau. De plus, une différence d'expression d'un gène (IL1 $\beta$ ) ne signifie pas nécessairement que l'IL1 $\beta$  est sécrétée de manière différentielle entre les sexes à E12.

#### 4. Absence d'effet d'une manipulation des œstrogènes sur l'activité de la microglie

Pour vérifier l'hypothèse selon laquelle les œstrogènes sont responsables de la différence d'expression d'IL1 $\beta$ , l'expérience 2 a analysé l'effet de l'exposition précoce aux œstrogènes sur l'expression d'IL1 $\beta$  à E12. Pour rappel, deux traitements ont été injectés dans des œufs à E7 : l'œstradiol benzoate (EB) et le Vorozole, un inhibiteur de la synthèse d'œstradiol. Les travaux précédents du laboratoire avaient montré un effet de ces traitements sur le nombre de cellules microgliales dans le POM (Delage & Cornil, 2020). L'EB augmente l'abondance microgliale chez les mâles, alors que le Vorozole la diminue chez les femelles. Ces traitements affectent la microglie, c'est pourquoi des résultats similaires étaient attendus pour l'expérience 2.

Cependant les résultats obtenus n'ont pas permis de confirmer notre hypothèse.

Tout d'abord, discutons de la fig. 23 qui illustre l'expression d'IL1 $\beta$  dans les groupes contrôles. La comparaison des mâles et femelles contrôles n'a pas répliqué les résultats

de l'expérience 1. Les contrôles sont respectivement l'huile pour le traitement EB et le propylène glycol en solution saline (PG) pour le Vorozole. Testés séparément, aucune différence d'expression entre les sexes n'a été observée ni dans la condition huile ni dans la condition PG, même si graphiquement la tendance est similaire à l'expérience 1 (les femelles exprimant plus d'IL1 $\beta$  que les mâles). Il est à noter aussi que pour le groupe des femelles PG, cette tendance n'est due qu'à un seul individu qui a une valeur particulièrement élevée, comme illustré par la barre d'erreur plus élevée pour ce groupe. Ceci suggère que le nombre d'individus (8) est peut-être trop petit. De plus, même si rien n'est significatif, l'expression d'IL1 $\beta$  pour les mâles et femelles PG semble plus élevée en comparaison avec l'expression du groupe huile et celle mesurée dans l'expérience 1. Il semblerait ainsi que le PG ait un effet stimulant sur l'expression de IL1 $\beta$ .

Ensuite, une exposition précoce à l'œstradiol benzoate (EB) au jour embryonnaire 7 n'a pas affecté l'expression de IL1 $\beta$  dans le HPOA au jour embryonnaire 12 chez les mâles et les femelles (fig. 24). Ces données ne supportent ainsi pas l'hypothèse selon laquelle l'exposition précoce aux œstrogènes augmenterait la production d'IL1 $\beta$ . Toutefois, le graphe montre une tendance à l'augmentation entre les mâles contrôles (huile) et les mâles EB, ce qui suggère quand même qu'avec un échantillon plus large, une exposition à l'EB pourrait augmenter l'expression d'IL1 $\beta$ , et par extension l'activité microgliale.

De façon similaire, l'administration de Vorozole au jour embryonnaire 7 n'affecte pas non plus l'expression d'IL1 $\beta$  dans le HPOA au jour embryonnaire 12 chez les mâles et les femelles (fig. 25). Cependant, il est important de rappeler ici que la comparaison des contrôles traités avec l'huile ou le PG suggère que le PG exerce un effet perturbateur sur l'expression d'IL1 $\beta$  et par conséquent que ces données ne sont peut-être pas fiables.

Pour résumer, l'expérience 2 n'a pas répliqué les résultats obtenus dans l'expérience 1 ni confirmé notre hypothèse d'un rôle des œstrogènes dans la différence sexuelle d'expression d'IL1 $\beta$ . Des hypothèses ont été émises pour tenter de comprendre ce qui aurait pu influencer les résultats. La première hypothèse concerne l'injection faite à E7. La cytokine étudiée, IL1 $\beta$ , est une cytokine pro-inflammatoire, par conséquent il est tout à fait possible que cette injection ait perturbé l'environnement de l'embryon et modifié l'expression de l'IL1 $\beta$ . La seconde hypothèse est toujours en lien avec la nature du gène étudié. Comme il est impliqué dans l'inflammation, il est possible que l'effet ne soit pas homogène dans le tissu et entre les individus étudiés. Ceci est illustré par les barres d'erreurs mâle EB et le groupe PN1 du gène IL10 qui sont plus grandes. Ce qui rejoint l'hypothèse énoncée plus haut : il est possible que la différence que l'on cherche à montrer ne soit pas facile à identifier et qu'un échantillon plus large permettrait peut-être de la



mettre en évidence. La troisième hypothèse concerne les dissections qui ont isolé le HPOA des individus : elles n'ont pas été réalisées par les mêmes personnes pour l'expérience 1 et 2. En effet, la dissection de la première expérience a été réalisée par Charlotte Cornil et moi-même, alors que pour la seconde expérience, j'ai été aidée par Ellen Remacle, technicienne au laboratoire, qui réalisait ses premières dissections. La troisième hypothèse est donc que les dissections réalisées pour l'expérience 2 sont moins précises, même si aucune différence de poids de HPOA n'a été relevée entre les deux expériences. Pour finir, la dernière hypothèse se porte sur le potentiel effet PG observé dans les groupes contrôles, celui-ci a influencé l'expression d'IL1 $\beta$ , dès lors, les données observées après traitements avec PG et Vorozole sont potentiellement problématiques.

## 5. Investigation future : 1<sup>er</sup> jour de vie

Lors de l'expérience 1, nous nous attendions à voir une différence d'expression entre les sexes principalement à E12, car ce jour correspond à la fin de la période sensible durant laquelle la microglie est plus abondante chez les femelles (Delage & Cornil, 2020). De manière intéressante, le 1<sup>er</sup> jour de vie (PN1) révèle des différences (non significatives) d'expression entre les sexes, notamment pour les gènes MCM5, RUNX-1 et l'IL10, en faveur des mâles. Ces données ne sont pas surprenantes étant donné qu'un pic de testostérone se produit à PN1 chez les mâles. Il est donc tout à fait possible que ce pic de testostérone impacte également le profil et l'activité de la microglie. L'expression plus importante de MCM5, RUNX-1 et IL10 à PN1 chez les mâles suggère que la microglie est sous une forme immature, en plus grand nombre, et plus active. De plus, pour le gène de l'IL10, l'expression était relativement continue et basse durant les jours embryonnaires (8,12 et 15) pour connaître un pic à PN1. Ensemble, ces résultats incitent à enquêter davantage sur ce moment du développement.

Toutefois, il est important de noter que des problèmes de normalisation des gènes de référence sur les gènes cibles ont été rencontrés à PN1. En effet pour certains gènes (RUNX-1, MCM5, CSF1R, IL34), la tendance d'expression entre les mâles et femelles s'inverse en fonction du choix du gène de référence. Souvenons-nous, 4 gènes avaient initialement été sélectionnés pour normaliser les gènes cibles : ACT, RPL32, PGK1 et GAPDH. Le défi était de sélectionner les gènes qui montraient l'expression la plus constante au cours du développement, pour que les différents jours embryonnaires et PN1 soient comparables entre eux. Seulement, les 4 gènes de référence ont montré des variations à PN1, ce qui a pour conséquence de tirer vers le haut ou le bas l'expression du gène cible, selon le gène de référence, et ce qui rend les résultats pour ces gènes à PN1 peu interprétables. Trouver un gène dont l'expression ne varie pas au cours du

développement n'est pas aisé, étant donné la diversité des tâches auxquelles un tissu doit répondre au cours de son développement.

Conclusions

et

perspectives

En conclusion, ce mémoire a permis d'apporter des informations exclusives quant à l'évolution de la microglie au cours du développement, à travers les gènes marqueurs de microglie précoce et pré-microglie, mais également à travers les gènes marqueurs de l'activité microgliale. Ces derniers ont mis en évidence une différence d'expression lors de la période sensible, conforme à l'attendu. Cependant, les résultats de l'expérience 2 n'ont pas permis de confirmer ce que notre laboratoire avait précédemment découvert, ni ce que l'expérience 1 avait démontré. Il semblerait que cette différence ne soit pas facile à illustrer, et par conséquent qu'un échantillon plus large serait favorable. En effet, les résultats ne suggèrent pas que l'exposition précoce à l'œstradiol influence l'activité microgliale durant la période sensible. La principale hypothèse pour expliquer cela, est que ces expériences-ci ont analysé un plus gros volume de tissu, le HPOA, alors que précédemment l'effet avait été observé dans le POM. Par conséquent, il est possible que l'effet observé dans le POM ait été dilué dans le HPOA. De ce fait, réaliser des qPCR sur le HPOA n'est sûrement pas la bonne approche pour prouver l'influence de l'œstradiol sur la microglie, puisque lors de la dissection, le POM est trop petit pour le cibler spécifiquement. De plus, le gène étudié pour évaluer l'activité microgliale étant une cytokine pro-inflammatoire, il est possible que les injections réalisées à E7 aient bouleversé l'environnement et interféré avec son expression. Pour finir, un effet du contrôle PG a également été observé, ce qui remet en question la fiabilité des données du groupe Vorozole.

De futures investigations pourraient être intéressantes pour analyser d'autres molécules impliquées dans l'inflammation afin de dresser un profil inflammatoire plus large des cerveaux mâles et femelles au cours du développement. Notamment l'interleukine 6, le TNF $\alpha$  et d'autres cytokines qui ont retenu notre attention mais pour lesquelles nous n'avons pas pu réaliser d'analyses lors de ce mémoire. De plus, des investigations au 1<sup>er</sup> jour de vie semblent également prometteuses. Enfin, l'abondance et l'activité microgliale dans des stades postnataux ultérieurs ou à l'âge adulte n'ont jamais été investiguées chez l'oiseau.

# Bibliographie

- Abrams, J. M., White, K., Fessler, L. I., & Steller, H. (1993). Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development*, *117*(1), 29–43. <https://doi.org/10.1242/dev.117.1.29>
- Adkins, E. K. (1976). Embryonic exposure to an antiestrogen masculinizes behavior of female quail. *Physiology & Behavior*, *17*(2), 357–359. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(76\)90088-3](https://doi.org/10.1016/0031-9384(76)90088-3)
- Adkins, E. K. (1979). Effect of Embryonic Treatment with Estradiol or Testosterone on Sexual Differentiation of the Quail Brain. Critical Period and Dose-Response Relationships. *Neuroendocrinology*, *29*(3), 178–185. <https://doi.org/10.1159/000122920>
- Adkins-Regan, E., Mansukhani, V., Seiwert, C., & Thompson, R. (1994). Sexual differentiation of brain and behavior in the zebra finch: Critical periods for effects of early estrogen treatment. *Journal of Neurobiology*, *25*(7), 865–877. <https://doi.org/10.1002/neu.480250710>
- Aleman, A., Kahn, R. S., & Selten, J.-P. (2003). Sex Differences in the Risk of Schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, *60*(6), 565. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.60.6.565>
- Alliot, F., Godin, I., & Pessac, B. (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Developmental Brain Research*, *117*(2), 145–152. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(99\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(99)00113-3)
- Altemus, M., Sarvaiya, N., & Neill Epperson, C. (2014). Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *35*(3), 320–330. <https://doi.org/10.1016/J.YFRNE.2014.05.004>
- Amateau, S. K., & McCarthy, M. M. (2002). Sexual Differentiation of Astrocyte Morphology in the Developing Rat Preoptic Area. *Journal of Neuroendocrinology*, *14*(11), 904–910. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2002.00858.x>
- Amateau, S. K., & McCarthy, M. M. (2004). Induction of PGE<sub>2</sub> by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior. *Nature Neuroscience*, *7*(6), 643–650. <https://doi.org/10.1038/nn1254>
- Amenyogbe, E., Chen, G., Wang, Z., Lu, X., Lin, M., & Lin, A. Y. (2020). A Review on Sex Steroid Hormone Estrogen Receptors in Mammals and Fish. *International Journal of Endocrinology*, *2020*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2020/5386193>
- Anderson, G. D. (2008). Chapter 1 Gender Differences in Pharmacological Response. *International Review of Neurobiology*, *83*, 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(08\)00001-9](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(08)00001-9)
- Ashwell, K. (1989). Development of microglia in the albino rabbit retina. *The Journal of Comparative Neurology*, *287*(3), 286–301. <https://doi.org/10.1002/cne.902870303>
- Ashwell, K. W. S., Holländer, H., Streit, W., & Stone, J. (1989). The appearance and distribution of microglia in the developing retina of the rat. *Visual Neuroscience*, *2*(5), 437–448. <https://doi.org/10.1017/S0952523800012335>
- Augusto-Oliveira, M., Arrifano, G. P., Delage, C. I., Tremblay, M., Crespo-Lopez, M. E., & Verkhatsky, A. (2022). Plasticity of microglia. *Biological Reviews*, *97*(1), 217–250. <https://doi.org/10.1111/brv.12797>

- Bakker, J., & Brock, O. (2010). Early estrogens in shaping reproductive networks: Evidence for a potential organizational role of estradiol in female brain development. *Journal of Neuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.02016.x>
- Baldereschi, M., di Carlo, A., Rocca, W. A., Vanni, P., Maggi, S., Perissinotto, E., Grigoletto, F., Amaducci, L., & Inzitari, D. (2000). Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: Two-fold higher incidence in men. *Neurology*, *55*(9), 1358–1363. <https://doi.org/10.1212/WNL.55.9.1358>
- Bálint, S., Czobor, P., Komlósi, S., Mészáros, Á., Simon, V., & Bitter, I. (2009). Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): gender- and age-related differences in neurocognition. *Psychological Medicine*, *39*(8), 1337–1345. <https://doi.org/10.1017/S0033291708004236>
- Ball, G. F., & Balthazart, J. (2010). Japanese Quail as a Model System for Studying the Neuroendocrine Control of Reproductive and Social Behaviors. *ILAR Journal*, *51*(4), 310–325. <https://doi.org/10.1093/ilar.51.4.310>
- Balthazart, J., & Adkins-Regan, E. (2002). Sexual Differentiation of Brain and Behavior in Birds. In *Hormones, Brain and Behavior* (pp. 223–301). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012532104-4/50068-8>
- Balthazart, J., de Clerck, A., & Foidart, A. (1992). Behavioral demasculinization of female quail is induced by estrogens: Studies with the new aromatase inhibitor, R76713. *Hormones and Behavior*, *26*(2), 179–203. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(92\)90041-S](https://doi.org/10.1016/0018-506X(92)90041-S)
- Balthazart, J., & Schumacher, M. (1984). Changes in testosterone metabolism by the brain and cloacal gland during sexual maturation in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Journal of Endocrinology*, *100*(1), 13–18. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1000013>
- Beato, M. (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Human Reproduction Update*, *6*(3), 225–236. <https://doi.org/10.1093/humupd/6.3.225>
- Becker, J. B., Prendergast, B. J., & Liang, J. W. (2016). Female rats are not more variable than male rats: a meta-analysis of neuroscience studies. *Biology of Sex Differences*, *7*(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s13293-016-0087-5>
- Beery, A. K., & Zucker, I. (2011). Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *35*(3), 565–572. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2010.07.002>
- Bilbo, S. D., Block, C. L., Bolton, J. L., Hanamsagar, R., & Tran, P. K. (2018). Beyond infection - Maternal immune activation by environmental factors, microglial development, and relevance for autism spectrum disorders. *Experimental Neurology*, *299*, 241–251. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.07.002>
- Brock, O., Baum, M. J., & Bakker, J. (2011). The Development of Female Sexual Behavior Requires Prepubertal Estradiol. *Journal of Neuroscience*, *31*(15), 5574–5578. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0209-11.2011>
- Brown, G. C., & Neher, J. J. (2010). Inflammatory Neurodegeneration and Mechanisms of Microglial Killing of Neurons. *Molecular Neurobiology*, *41*(2–3), 242–247. <https://doi.org/10.1007/s12035-010-8105-9>

- Carere, C., & Balthazart, J. (2007). Sexual versus individual differentiation: the controversial role of avian maternal hormones. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 18(2), 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.01.003>
- Catalá-López, F., Peiró, S., Ridaó, M., Sanfèlix-Gimeno, G., Gènova-Maleras, R., & Catalá, M. A. (2012). Prevalence of attention deficit hyperactivity disorder among children and adolescents in Spain: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *BMC Psychiatry*, 12(1), 168. <https://doi.org/10.1186/1471-244X-12-168>
- Chihara, T., Suzu, S., Hassan, R., Chutiwitoonchai, N., Hiyoshi, M., Motoyoshi, K., Kimura, F., & Okada, S. (2010). IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation. *Cell Death & Differentiation*, 17(12), 1917–1927. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.60>
- Chitu, V., Gokhan, Ş., Nandi, S., Mehler, M. F., & Stanley, E. R. (2016). Emerging Roles for CSF-1 Receptor and its Ligands in the Nervous System. *Trends in Neurosciences*, 39(6), 378–393. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2016.03.005>
- Chitu, V., & Stanley, E. R. (2017). *Regulation of Embryonic and Postnatal Development by the CSF-1 Receptor* (pp. 229–275). <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.10.004>
- Chue, J., & Smith, C. A. (2011). Sex determination and sexual differentiation in the avian model. *FEBS Journal*, 278(7), 1027–1034. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08032.x>
- Clayton, J. A., & Collins, F. S. (2014). Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. *Nature*, 509(7500), 282–283. <https://doi.org/10.1038/509282a>
- Cloarec, R., Bauer, S., Luche, H., Buhler, E., Pallesi-Pocachard, E., Salmi, M., Courtens, S., Massacrier, A., Grenot, P., Teissier, N., Watrin, F., Schaller, F., Adle-Biassette, H., Gressens, P., Malissen, M., Stamminger, T., Streblow, D. N., Bruneau, N., & Szeppetowski, P. (2016). Cytomegalovirus Infection of the Rat Developing Brain In Utero Prominently Targets Immune Cells and Promotes Early Microglial Activation. *PLOS ONE*, 11(7), e0160176. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160176>
- Crain, J. M., Nikodemova, M., & Watters, J. J. (2013). Microglia express distinct M1 and M2 phenotypic markers in the postnatal and adult central nervous system in male and female mice. *Journal of Neuroscience Research*, 91(9), 1143–1151. <https://doi.org/10.1002/jnr.23242>
- Cuadros, M. A., Martin, C., Coltey, P., Almendros, A., & Navascués, J. (1993). First appearance, distribution, and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *Journal of Comparative Neurology*, 330(1), 113–129. <https://doi.org/10.1002/cne.903300110>
- Cuadros, M. A., & Navascués, J. (1998). The origin and differentiation of microglial cells during development. *Progress in Neurobiology*, 56(2), 173–189. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00035-5](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00035-5)
- Cuadros, M. A., Rodríguez-Ruiz, J., Calvente, R., Almendros, A., Marín-Teva, J. L., & Navascués, J. (1997). Microglia development in the quail cerebellum. *The Journal of Comparative Neurology*, 389(3), 390–401. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19971222\)389:3<390::AID-CNE3>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19971222)389:3<390::AID-CNE3>3.0.CO;2-W)



- Cunningham, C. L., Martinez-Cerdeno, V., & Noctor, S. C. (2013). Microglia Regulate the Number of Neural Precursor Cells in the Developing Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience*, *33*(10), 4216–4233. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3441-12.2013>
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. v, Zuo, Y., Jung, S., Littman, D. R., Dustin, M. L., & Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, *8*(6), 752–758. <https://doi.org/10.1038/nn1472>
- Delage, C. I., & Cornil, C. A. (2020). Estrogen-dependent sex difference in microglia in the developing brain of Japanese quail ( *Coturnix japonica* ). *Developmental Neurobiology*, *80*(7–8), 239–262. <https://doi.org/10.1002/dneu.22781>
- Delage, C. I., Nys, G., Fillet, M., & Cornil, C. A. (2021). Effect of cyclo-oxygenase inhibition on embryonic microglia and the sexual differentiation of the brain and behavior of Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Hormones and Behavior*, *134*, 105024. <https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2021.105024>
- Elmore, M. R. P., Najafi, A. R., Koike, M. A., Dagher, N. N., Spangenberg, E. E., Rice, R. A., Kitazawa, M., Matusow, B., Nguyen, H., West, B. L., & Green, K. N. (2014). Colony-Stimulating Factor 1 Receptor Signaling Is Necessary for Microglia Viability, Unmasking a Microglia Progenitor Cell in the Adult Brain. *Neuron*, *82*(2), 380–397. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2014.02.040>
- Erblich, B., Zhu, L., Etgen, A. M., Dobrenis, K., & Pollard, J. W. (2011). Absence of Colony Stimulation Factor-1 Receptor Results in Loss of Microglia, Disrupted Brain Development and Olfactory Deficits. *PLoS ONE*, *6*(10), e26317. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026317>
- Fombonne, E. (2003). Epidemiological Surveys of Autism and Other Pervasive Developmental Disorders: An Update. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *33*(4), 365–382. <https://doi.org/10.1023/A:1025054610557>
- Garavito, R. M., & DeWitt, D. L. (1999). The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1441*(2–3), 278–287. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(99\)00147-X](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(99)00147-X)
- Gehrmann, J., Matsumoto, Y., & Kreutzberg, G. W. (1995). Microglia: Intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Research Reviews*, *20*(3), 269–287. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(94\)00015-H](https://doi.org/10.1016/0165-0173(94)00015-H)
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., & Merad, M. (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science*, *330*(6005), 841–845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
- Ginhoux, F., Tacke, F., Angeli, V., Bogunovic, M., Loubreau, M., Dai, X.-M., Stanley, E. R., Randolph, G. J., & Merad, M. (2006). Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nature Immunology*, *7*(3), 265–273. <https://doi.org/10.1038/ni1307>
- Gorski, R. A., Gordon, J. H., Shryne, J. E., & Southam, A. M. (1978). Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Research*, *148*(2), 333–346. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90723-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90723-0)

- Greter, M., Lelios, I., Pelczar, P., Hoeffel, G., Price, J., Leboeuf, M., Kündig, T. M., Frei, K., Ginhoux, F., Merad, M., & Becher, B. (2012). Stroma-Derived Interleukin-34 Controls the Development and Maintenance of Langerhans Cells and the Maintenance of Microglia. *Immunity*, *37*(6), 1050–1060. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.001>
- Guioli, S., Nandi, S., Zhao, D., Burgess-Shannon, J., Lovell-Badge, R., & Clinton, M. (2014). Gonadal Asymmetry and Sex Determination in Birds. *Sexual Development*, *8*(5), 227–242. <https://doi.org/10.1159/000358406>
- Hammond, T. R., Dufort, C., Dissing-Olesen, L., Giera, S., Young, A., Wysoker, A., Walker, A. J., Gergits, F., Segel, M., Nemes, J., Marsh, S. E., Saunders, A., Macosko, E., Ginhoux, F., Chen, J., Franklin, R. J. M., Piao, X., McCarroll, S. A., & Stevens, B. (2019). Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. *Immunity*, *50*(1), 253–271.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.11.004>
- Haynes, S. E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M. E., Gan, W.-B., & Julius, D. (2006). The P2Y<sub>12</sub> receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nature Neuroscience*, *9*(12), 1512–1519. <https://doi.org/10.1038/nn1805>
- Herbomel, P., Thisse, B., & Thisse, C. (2001). Zebrafish Early Macrophages Colonize Cephalic Mesenchyme and Developing Brain, Retina, and Epidermis through a M-CSF Receptor-Dependent Invasive Process. *Developmental Biology*, *238*(2), 274–288. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0393>
- Herwald, H., & Egesten, A. (2011). Editorial. *Journal of Innate Immunity*, *3*(5), 435–436. <https://doi.org/10.1159/000330635>
- Hickman, S., Izzy, S., Sen, P., Morsett, L., & el Khoury, J. (2018). Microglia in neurodegeneration. *Nature Neuroscience*, *21*(10), 1359–1369. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0242-x>
- Hiller, R. M., Young, R. L., & Weber, N. (2016). Sex differences in pre-diagnosis concerns for children later diagnosed with autism spectrum disorder. *Autism*, *20*(1), 75–84. <https://doi.org/10.1177/1362361314568899>
- Hiller-Sturmhöfel, S., & Bartke, A. (1998). The endocrine system: an overview. *Alcohol Health and Research World*, *22*(3), 153–164.
- Hull, E. M., & Dominguez, J. M. (2007). Sexual behavior in male rodents. *Hormones and Behavior*, *52*(1), 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.03.030>
- Intarapat, S., & Satayalai, O. (2014). Microanatomical Study of Embryonic Gonadal Development in Japanese Quail ( *Coturnix japonica* ). *Anatomy Research International*, *2014*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/168614>
- Irvine, K., Laws, K. R., Gale, T. M., & Kondel, T. K. (2012). Greater cognitive deterioration in women than men with Alzheimer's disease: A meta analysis. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, *34*(9), 989–998. <https://doi.org/10.1080/13803395.2012.712676>
- Itoh, Y., & Arnold, A. P. (2015). Are females more variable than males in gene expression? Meta-analysis of microarray datasets. *Biology of Sex Differences*, *6*(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s13293-015-0036-8>

- Jessen, K. R. (2004). Glial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(10), 1861–1867. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2004.02.023>
- Jung, S., & Schwartz, M. (2012). Non-Identical Twins – Microglia and Monocyte-Derived Macrophages in Acute Injury and Autoimmune Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00089>
- Kaufmann, W. E., Andreasson, K. I., Isakson, P. C., & Worley, P. F. (1997). Cyclooxygenases and the Central Nervous System. *Prostaglandins*, 54(3), 601–624. [https://doi.org/10.1016/S0090-6980\(97\)00128-7](https://doi.org/10.1016/S0090-6980(97)00128-7)
- Kessler, R. C., McGonagle, K. A., Swartz, M., Blazer, D. G., & Nelson, C. B. (1993). Sex and depression in the National Comorbidity Survey I: Lifetime prevalence, chronicity and recurrence. *Journal of Affective Disorders*, 29(2–3), 85–96. [https://doi.org/10.1016/0165-0327\(93\)90026-G](https://doi.org/10.1016/0165-0327(93)90026-G)
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of Microglia. *Physiological Reviews*, 91(2), 461–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., & Verkhratsky, A. (2013). Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron*, 77(1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.023>
- Khosla, S., & Monroe, D. G. (2018). Regulation of Bone Metabolism by Sex Steroids. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(1), a031211. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031211>
- Kierdorf, K., & Prinz, M. (2013). Factors regulating microglia activation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00044>
- Ledeboer, A., Sloane, E. M., Milligan, E. D., Frank, M. G., Mahony, J. H., Maier, S. F., & Watkins, L. R. (2005). Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain*, 115(1–2), 71–83. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2005.02.009>
- Lehrman, E. K., Wilton, D. K., Litvina, E. Y., Welsh, C. A., Chang, S. T., Frouin, A., Walker, A. J., Heller, M. D., Umemori, H., Chen, C., & Stevens, B. (2018). CD47 Protects Synapses from Excess Microglia-Mediated Pruning during Development. *Neuron*, 100(1), 120-134.e6. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2018.09.017>
- Lenz, K. M., & Nelson, L. H. (2018). Microglia and Beyond: Innate Immune Cells As Regulators of Brain Development and Behavioral Function. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00698>
- Lenz, K. M., Nugent, B. M., Haliyur, R., & McCarthy, M. M. (2013). Microglia Are Essential to Masculinization of Brain and Behavior. *Journal of Neuroscience*, 33(7), 2761–2772. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1268-12.2013>
- Lenz, K. M., Nugent, B. M., & McCarthy, M. M. (2012). Sexual Differentiation of the Rodent Brain: Dogma and Beyond. *Frontiers in Neuroscience*, 6. <https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00026>
- Lenz, K. M., Pickett, L. A., Wright, C. L., Davis, K. T., Joshi, A., & McCarthy, M. M. (2018). Mast Cells in the Developing Brain Determine Adult Sexual Behavior. *The Journal of Neuroscience*, 38(37), 8044–8059. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1176-18.2018>

- Levi, G., Minghetti, L., & Aloisi, F. (1998). Regulation of prostanoid synthesis in microglial cells and effects of prostaglandin E2 on microglial functions. *Biochimie*, *80*(11), 899–904. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)88886-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)88886-0)
- Lively, S., Wong, R., Lam, D., & Schlichter, L. C. (2018). Sex- and Development-Dependent Responses of Rat Microglia to Pro- and Anti-inflammatory Stimulation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00433>
- Lonstein, J. S., & de Vries, G. J. (2000). Maternal behaviour in lactating rats stimulates c-fos in glutamate decarboxylase-synthesizing neurons of the medial preoptic area, ventral bed nucleus of the stria terminalis, and ventrocaudal periaqueductal gray. *Neuroscience*, *100*(3), 557–568. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00287-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00287-6)
- Marín, O. (2012). Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(2), 107–120. <https://doi.org/10.1038/nrn3155>
- Marin-Teva, J. L., Almendros, A., Calvente, R., Cuadros, M. A., & Navascus, J. (1998). Tangential migration of ameboid microglia in the developing quail retina: Mechanism of migration and migratory behavior. *Glia*, *22*(1), 31–52. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199801\)22:1<31::AID-GLIA4>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199801)22:1<31::AID-GLIA4>3.0.CO;2-B)
- Matcovitch-Natan, O., Winter, D. R., Giladi, A., Vargas Aguilar, S., Spinrad, A., Sarrazin, S., Ben-Yehuda, H., David, E., Zelada González, F., Perrin, P., Keren-Shaul, H., Gury, M., Lara-Astaiso, D., Thaïss, C. A., Cohen, M., Bahar Halpern, K., Baruch, K., Deczkowska, A., Lorenzo-Vivas, E., ... Amit, I. (2016). Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science*, *353*(6301). <https://doi.org/10.1126/science.aad8670>
- McCarthy, M. M. (2010). How it's Made: Organisational Effects of Hormones on the Developing Brain. *Journal of Neuroendocrinology*, *22*(7), 736–742. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.02021.x>
- McCarthy, M. M. (2019). Sex differences in neuroimmunity as an inherent risk factor. *Neuropsychopharmacology*, *44*(1), 38–44. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0138-1>
- McEwen, B. S., & Alves, S. E. (1999). Estrogen Actions in the Central Nervous System. *Endocrine Reviews*, *20*(3), 279–307. <https://doi.org/10.1210/edrv.20.3.0365>
- Nandi, S., Gokhan, S., Dai, X. M., Wei, S., Enikolopov, G., Lin, H., Mehler, M. F., & Richard Stanley, E. (2012). The CSF-1 receptor ligands IL-34 and CSF-1 exhibit distinct developmental brain expression patterns and regulate neural progenitor cell maintenance and maturation. *Developmental Biology*, *367*(2), 100–113. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2012.03.026>
- Nelson. (2005). *An Introduction to Behavioral Endocrinology*.
- Nelson, L. H., Warden, S., & Lenz, K. M. (2017). Sex differences in microglial phagocytosis in the neonatal hippocampus. *Brain, Behavior, and Immunity*, *64*, 11–22. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2017.03.010>
- Newton, K., & Dixit, V. M. (2012). *Signaling in innate immunity and inflammation*.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science*, *308*(5726), 1314–1318. <https://doi.org/10.1126/science.1110647>

- Oosterhof, N., Chang, I. J., Karimiani, E. G., Kuil, L. E., Jensen, D. M., Daza, R., Young, E., Astle, L., van der Linde, H. C., Shivaram, G. M., Demmers, J., Latimer, C. S., Keene, C. D., Loter, E., Maroofian, R., van Ham, T. J., Hevner, R. F., & Bennett, J. T. (2019). Homozygous Mutations in CSF1R Cause a Pediatric-Onset Leukoencephalopathy and Can Result in Congenital Absence of Microglia. *The American Journal of Human Genetics*, *104*(5), 936–947. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2019.03.010>
- Orcutt, F. S. (1971). Effects of oestrogen on the differentiation of some reproductive behaviours in male pigeons (*Columba livia*). *Animal Behaviour*, *19*(2), 277–286. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(71\)80008-8](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(71)80008-8)
- Orikasa, C., Kondo, Y., Hayashi, S., McEwen, B. S., & Sakuma, Y. (2002). Sexually dimorphic expression of estrogen receptor  $\beta$  in the anteroventral periventricular nucleus of the rat preoptic area: Implication in luteinizing hormone surge. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(5), 3306–3311. <https://doi.org/10.1073/pnas.052707299>
- Ottinger, M. A., & Brinkley, H. J. (1979). Testosterone and Sex Related Physical Characteristics during the Maturation of the Male Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Biology of Reproduction*, *20*(4), 905–909. <https://doi.org/10.1095/biolreprod20.4.905>
- Ottinger, M. A., Pitts, S., & Abdelnabi, M. A. (2001). Steroid Hormones During Embryonic Development in Japanese Quail: Plasma, Gonadal, and Adrenal Levels. *Poultry Science*, *80*(6), 795–799. <https://doi.org/10.1093/ps/80.6.795>
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2011). Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science*, *333*(6048), 1456–1458. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>
- Phoenix, C. H., GOY, R. W., GERRALL, A. A., & YOUNG, W. C. (1959). ORGANIZING ACTION OF PRENATALLY ADMINISTERED TESTOSTERONE PROPIONATE ON THE TISSUES MEDIATING MATING BEHAVIOR IN THE FEMALE GUINEA PIG <sup>1</sup>. *Endocrinology*, *65*(3), 369–382. <https://doi.org/10.1210/endo-65-3-369>
- Plassman, B. L., Langa, K. M., McCammon, R. J., Fisher, G. G., Potter, G. G., Burke, J. R., Steffens, D. C., Foster, N. L., Giordani, B., Unverzagt, F. W., Welsh-Bohmer, K. A., Heeringa, S. G., Weir, D. R., & Wallace, R. B. (2011). Incidence of dementia and cognitive impairment, not dementia in the united states. *Annals of Neurology*, *70*(3), 418–426. <https://doi.org/10.1002/ana.22362>
- Prinz, M., Jung, S., & Priller, J. (2019). Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell*, *179*(2), 292–311. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.053>
- Raisman, G., & Field, P. M. (1973). Sexual dimorphism in the neurophil of the preoptic area of the rat and its dependence on neonatal androgen. *Brain Research*, *54*(C), 1–29. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(73\)90030-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(73)90030-9)
- Rezaie, P., Patel, K., & Male, D. K. (1999). Microglia in the human fetal spinal cord—patterns of distribution, morphology and phenotype. *Developmental Brain Research*, *115*(1), 71–81. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(99\)00043-7](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(99)00043-7)

- Ricciotti, E., & FitzGerald, G. A. (2011). Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(5), 986–1000. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449>
- Santen, R. J., Brodie, H., Simpson, E. R., Siiteri, P. K., & Brodie, A. (2009). History of Aromatase: Saga of an Important Biological Mediator and Therapeutic Target. *Endocrine Reviews*, 30(4), 343–375. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0016>
- Sayag, N., Robinzon, B., Snapir, N., Arnon, E., & Grimm, V. E. (1991). The effects of embryonic treatments with gonadal hormones on sexually dimorphic behavior of chicks. *Hormones and Behavior*, 25(2), 137–153. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(91\)90047-L](https://doi.org/10.1016/0018-506X(91)90047-L)
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., Ransohoff, R. M., Greenberg, M. E., Barres, B. A., & Stevens, B. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron*, 74(4), 691–705. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2012.03.026>
- Schiffer, L., Barnard, L., Baranowski, E. S., Gilligan, L. C., Taylor, A. E., Arlt, W., Shackleton, C. H. L., & Storbeck, K.-H. (2019). Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 194, 105439. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105439>
- Schulz, K. M., & Sisk, C. L. (2006). Pubertal hormones, the adolescent brain, and the maturation of social behaviors: Lessons from the Syrian hamster. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 254–255, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.04.025>
- Schumacher, M., Hutchison, R. E., & Hutchison, J. B. (1988). Ontogeny of testosterone-inducible brain aromatase activity. *Brain Research*, 441(1–2), 98–110. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)91387-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)91387-X)
- Schumacher, M., Sulon, J., & Balthazart, J. (1988). Changes in serum concentrations of steroids during embryonic and post-hatching development of male and female Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Journal of Endocrinology*, 118(1), 127–134. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1180127>
- Schwarz, J. M., Sholar, P. W., & Bilbo, S. D. (2012). Sex differences in microglial colonization of the developing rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 120(6), 948–963. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07630.x>
- Shansky, R. M., & Murphy, A. Z. (2021). Considering sex as a biological variable will require a global shift in science culture. *Nature Neuroscience*, 24(4), 457–464. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00806-8>
- Sheng, J., Ruedl, C., & Karjalainen, K. (2015). Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity*, 43(2), 382–393. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.016>
- Sierra, A., Abiega, O., Shahraz, A., & Neumann, H. (2013). Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00006>
- Sierra, A., de Castro, F., del Río-Hortega, J., Rafael Iglesias-Rozas, J., Garrosa, M., & Kettenmann, H. (2016). The “Big-Bang” for modern glial biology: Translation and

- comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia*, 64(11), 1801–1840. <https://doi.org/10.1002/glia.23046>
- Sierra, A., Encinas, J. M., Deudero, J. J. P., Chancey, J. H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L. S., Tsirka, S. E., & Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia Shape Adult Hippocampal Neurogenesis through Apoptosis-Coupled Phagocytosis. *Cell Stem Cell*, 7(4), 483–495. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2010.08.014>
- Sierra, A., Gottfried-Blackmore, A., Milner, T. A., McEwen, B. S., & Bulloch, K. (2008). Steroid hormone receptor expression and function in microglia. *Glia*, 56(6), 659–674. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/glia.20644>
- Simard, A. R., & Rivest, S. (2006). Neuroprotective properties of the innate immune system and bone marrow stem cells in Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry*, 11(4), 327–335. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001809>
- Smith, C. A., & Sinclair, A. H. (2004). Sex determination: insights from the chicken. *BioEssays*, 26(2), 120–132. <https://doi.org/10.1002/bies.10400>
- Squarzoni, P., Oller, G., Hoeffel, G., Pont-Lezica, L., Rostaing, P., Low, D., Bessis, A., Ginhoux, F., & Garel, S. (2014). Microglia Modulate Wiring of the Embryonic Forebrain. *Cell Reports*, 8(5), 1271–1279. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2014.07.042>
- STOFFEL-WAGNER, B. (2003). Neurosteroid Biosynthesis in the Human Brain and Its Clinical Implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1007(1), 64–78. <https://doi.org/10.1196/annals.1286.007>
- Swinnen, N., Smolders, S., Avila, A., Notelaers, K., Paesen, R., Ameloot, M., Brône, B., Legendre, P., & Rigo, J.-M. (2013). Complex invasion pattern of the cerebral cortex by microglial cells during development of the mouse embryo. *Glia*, 61(2), 150–163. <https://doi.org/10.1002/glia.22421>
- Tay, T. L., Hagemeyer, N., & Prinz, M. (2016). The force awakens: insights into the origin and formation of microglia. *Current Opinion in Neurobiology*, 39, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.04.003>
- Thibaut, F. (2016). The role of sex and gender in neuropsychiatric disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 18(4), 351–352. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2016.18.4/ftthibaut>
- Thion, M. S., & Garel, S. (2017). On place and time: microglia in embryonic and perinatal brain development. *Current Opinion in Neurobiology*, 47, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.10.004>
- Trenti, A., Tedesco, S., Boscaro, C., Trevisi, L., Bolego, C., & Cignarella, A. (2018). Estrogen, Angiogenesis, Immunity and Cell Metabolism: Solving the Puzzle. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 859. <https://doi.org/10.3390/ijms19030859>
- Turano, A., Lawrence, J. H., & Schwarz, J. M. (2017). Activation of neonatal microglia can be influenced by other neural cells. *Neuroscience Letters*, 657, 32–37. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2017.07.052>
- van Wijngaarden-Cremers, P. J. M., van Eeten, E., Groen, W. B., van Deurzen, P. A., Oosterling, I. J., & van der Gaag, R. J. (2014). Gender and Age Differences in the Core

Triad of Impairments in Autism Spectrum Disorders: A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 44(3), 627–635.  
<https://doi.org/10.1007/s10803-013-1913-9>

VanRyzin, J. W., Marquardt, A. E., Argue, K. J., Vecchiarelli, H. A., Ashton, S. E., Arambula, S. E., Hill, M. N., & McCarthy, M. M. (2019). Microglial Phagocytosis of Newborn Cells Is Induced by Endocannabinoids and Sculptures Sex Differences in Juvenile Rat Social Play. *Neuron*, 102(2), 435–449.e6. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2019.02.006>

VanRyzin, J. W., Marquardt, A. E., Pickett, L. A., & McCarthy, M. M. (2020). Microglia and sexual differentiation of the developing brain: A focus on extrinsic factors. *Glia*, 68(6), 1100–1113. <https://doi.org/10.1002/glia.23740>

Verney, C., Monier, A., Fallet-Bianco, C., & Gressens, P. (2010). Early microglial colonization of the human forebrain and possible involvement in periventricular white-matter injury of preterm infants. *Journal of Anatomy*, 217(4), 436–448. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01245.x>

Wang, Y., & Colonna, M. (2014). Interleukin-34, a cytokine crucial for the differentiation and maintenance of tissue resident macrophages and Langerhans cells. *European Journal of Immunology*, 44(6), 1575–1581. <https://doi.org/10.1002/eji.201344365>

Wang, Y., Szretter, K. J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., Barrow, A. D., Diamond, M. S., & Colonna, M. (2012). IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nature Immunology*, 13(8), 753–760. <https://doi.org/10.1038/ni.2360>

Wei, S., Nandi, S., Chitu, V., Yeung, Y.-G., Yu, W., Huang, M., Williams, L. T., Lin, H., & Stanley, E. R. (2010). Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 88(3), 495–505. <https://doi.org/https://doi.org/10.1189/jlb.1209822>

Wilson, J., & Glick, B. (1970). Ontogeny of mating behavior in the chicken. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 218(4), 951–955.  
<https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1970.218.4.951>

Wlodarczyk, A., Holtman, I. R., Krueger, M., Yogev, N., Bruttger, J., Khoroshii, R., Benmamar-Badel, A., Boer-Bergsma, J. J., Martin, N. A., Karram, K., Kramer, I., Boddeke, E. W., Waisman, A., Eggen, B. J., & Owens, T. (2017). A novel microglial subset plays a key role in myelinogenesis in developing brain. *The EMBO Journal*, 36(22), 3292–3308. <https://doi.org/10.15252/embj.201696056>

Wright, C. L., & McCarthy, M. M. (2009). Prostaglandin E2-Induced Masculinization of Brain and Behavior Requires Protein Kinase A, AMPA/Kainate, and Metabotropic Glutamate Receptor Signaling. *Journal of Neuroscience*, 29(42), 13274–13282.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3603-09.2009>

Wu, J., Gale, C. P., Hall, M., Dondo, T. B., Metcalfe, E., Oliver, G., Batin, P. D., Hemingway, H., Timmis, A., & West, R. M. (2018). Editor's Choice - Impact of initial hospital diagnosis on mortality for acute myocardial infarction: A national cohort study. *European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care*, 7(2), 139–148.  
<https://doi.org/10.1177/2048872616661693>

Zucker, I., & Beery, A. K. (2010). Males still dominate animal studies. *Nature*, 465(7299), 690–690. <https://doi.org/10.1038/465690a>



# Annexe

# 1. Complément d'information sur la microglie

## 1.1. Forme surveillante

La forme surveillante, anciennement nommée microglie au repos ou microglie quiescente est celle qui prédomine dans un tissu sain. Dans cette configuration, la microglie possède un petit corps cellulaire fixe et de longs et fins processus de ramification très mobiles. Ces ramifications inspectent en permanence l'environnement (Davalos et al., 2005) et montrent des aptitudes assez impressionnantes. Premièrement, elles sont capables de voyager à une distance de 100 µm de diamètre autour du corps cellulaire. En outre, elles seraient les structures cellulaires les plus rapides dans le cerveau sain, avec une vitesse de 1 à 3 µm par minute. Les processus de ramification sont capables d'établir un contact avec les neurones, les astrocytes et les vaisseaux sanguins et de se rétracter en quelques minutes pour interagir avec une autre cellule (Davalos et al., 2005 ; Nimmerjahn et al., 2005 ; Stratoulis et al., 2019).

La microglie exerce aussi un rôle dans la neurogenèse et la plasticité synaptique à l'âge adulte, rôles communs à la microglie durant le développement. Premièrement, elle phagocyte les progéniteurs neuronaux, dans la zone sous granulaire du gyrus denté de l'hippocampe. En effet, même à l'âge adulte, cette région du cerveau est toujours une région de neurogenèse et la microglie continue d'exercer cette action de régulation du pool de progéniteurs. Ensuite, la microglie oriente la différenciation de ces cellules progénitrices de la zone sous granulaire, et elle sécrète aussi des facteurs qui influencent leur survie (Sierra et al., 2010). Etant donné que ce rôle de la microglie n'a été découvert que récemment, et que la microglie a surtout été étudiée dans un contexte pathologique, tous les mécanismes impliqués ne sont pas encore connus.

## 1.2. Forme activée

Voici quelques exemples de voies d'activation de la microglie lors de sa forme activée.

Un signal de danger est par exemple une exposition à un pathogène, qui exprime un signal PAMP (modèle moléculaire associé aux agents pathogènes). Un signal de dommage est par exemple une cellule qui a été lysée, et par conséquent son matériel intracellulaire qui se retrouve en extra-cellulaire, ce qui active le signal DAMP (modèle moléculaire associé aux dommages). Ces PAMPs et DAMPs sont reconnus par la famille des PRR (*cfr* ci-dessus), exprimés par les microglies (Newton & Dixit, 2012). Cette interaction prolongée active une voie de signalisation qui stimule NF-κB, qui lui-même mène à la production d'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et de cyclooxygénase 2 (COX-2). Ces 2 enzymes vont elles aussi produire des molécules

pro-inflammatoires, respectivement du monoxyde d'azote (NO) et des prostanoïdes (Brown & Neher, 2010).

Une autre voie, plus rapide, permet de changer la morphologie des processus de ramifications de la microglie, de passer de long et fin à court et absent afin de permettre à la microglie de migrer vers la zone touchée. Cette voie implique de l'ATP, qui se lie aux récepteurs purinergiques de la microglie (P2Y<sub>12</sub> et A<sub>2A</sub>) (Davalos et al., 2005). Le recrutement en masse s'opère par chimiotactisme, par des signaux de type « trouve moi » qui peuvent être : une concentration élevée de nucléotides, de cytokines ou de glutamate (Haynes et al., 2006).

La microglie peut elle-même recruter et activer d'autres microglies par sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 1 beta (IL1B), le TNF $\alpha$  et le NO. Lorsqu'une cellule est mourante dans une zone inflammatoire, elle exprime des signaux « mange-moi », mais aussi des espèces réactives à l'oxygène (ROS) qui vont impacter les cellules voisines et les soumettre à un stress. Ces cellules voisines stressées vont alors aussi sécréter des ROS afin d'amplifier l'inflammation.

Lorsque la source de l'inflammation a disparu, à savoir le contenu intracellulaire ou le pathogène a été digéré, l'inflammation s'arrête progressivement, avec le changement des signaux « trouve moi » et « mange-moi » au profit de signaux « ne me mange pas ». Les cellules voisines, petit à petit, ne sont plus soumises à un stress et diminuent leur sécrétion de ROS. La microglie sécrète alors des cytokines anti-inflammatoires, comme l'interleukine 10 (IL10) et des facteurs de croissance, comme le facteur de croissance de transformation beta (TGF $\beta$ ), pour amplifier la fin de l'inflammation. Attention toutefois, certaines molécules peuvent être à la fois pro- et anti-inflammatoires, et donc exercer des effets tantôt neuroprotecteurs et tantôt cytotoxiques, en fonction du contexte.

### 1.3. Implication de la microglie dans les maladies neurodégénératives et psychiatriques

Il semblerait que les femmes soient plus susceptibles de présenter un trouble émotionnel qui se développerait après la puberté, alors que les hommes seraient plus touchés par des troubles développementaux qui induiraient des maladies mentales (Thibaut, 2016). Concernant les maladies neurodégénératives, les hommes sont 3 fois plus touchés par la maladie de Parkinson, tandis que les femmes sont 3 fois plus atteintes de la maladie d'Alzheimer (Baldereschi et al., 2000; Irvine et al., 2012; Plassman et al., 2011).

Ces données sont à considérer en sachant qu'il existe des biais dans la détection des pathologies neurologiques. En effet, les symptômes et manifestations peuvent être

différents chez les femmes, et étant donné que la recherche scientifique se concentrait presque exclusivement sur des individus masculins (Zucker & Beery, 2010), les femmes sont victimes de mauvais diagnostic (Shansky & Murphy, 2021). C'est le cas des arrêts cardiaques, qui sont diagnostiqués plus tard chez les femmes car les symptômes sont différents de ceux des hommes qui sont considérés comme la norme. Cela entraîne donc un retard de prise en charge et par conséquent de traitement, ce qui peut engendrer de lourdes conséquences (Wu et al., 2018). Un autre exemple est l'autisme, qui est moins diagnostiqué et plus tard chez les filles (Hiller et al., 2016).

Dans certains cas, le diagnostic est posé mais les femmes souffrent alors d'effets secondaires indésirables, plus nombreux et plus fréquents, puisque les études pré-cliniques considèrent majoritairement des individus masculins (Anderson, 2008). En 2011, une évaluation des études en neurosciences a révélé que les individus masculins sont 6 fois plus présents dans les cohortes expérimentales (Beery & Zucker, 2011). Dans cet article, les chercheurs disent même qu'être de sexe féminin est considéré comme un facteur de risque d'effets indésirables cliniquement pertinents (Anderson, 2008). Une des raisons serait que les scientifiques craignent que le cycle menstruel des femelles n'interfère avec les résultats et induise une variabilité, ou que celui-ci soit simplement à prendre en compte, ce qui peut compliquer le design de l'étude. Pourtant, plusieurs études récentes ont démontré que les femelles ne sont pas plus variables que les mâles (Becker et al., 2016; Itoh & Arnold, 2015). Cette tendance est en train de s'équilibrer, notamment grâce à l'initiative du National Institutes of Health (NIH) qui a imposé de considérer le sexe comme variable biologique dans les projets qu'elle finance (Clayton & Collins, 2014). Ceci, non pas seulement dans un but d'inclusivité, mais pour nous aider à comprendre les mécanismes sous-jacents de l'apparition de troubles et les effets protecteurs ou déclencheurs des messagers chimiques, pour *in fine* pouvoir trouver un traitement.

La microglie est donc impliquée dans beaucoup de processus aussi bien durant le développement qu'à l'âge adulte. Et étant donné qu'elle fait partie du système immunitaire, elle est sensible aux bouleversements extérieurs qui peuvent *in fine* causer des troubles ou pathologies. Par exemple, l'exposition gestationnelle à un pathogène (virus, bactéries...), le virus de la grippe au cours du 1er trimestre, augmente par 7 le risque pour le fœtus de développer la schizophrénie (Brown et al., 2004). Cette exposition gestationnelle est appelée activation immunitaire maternelle (MIA), et celle-ci perturbe le développement de la microglie (Matcovitch-Natan et al., 2016). En réalité, c'est la réponse immunitaire maternelle et non le pathogène en lui-même qui perturbe le développement fœtal. En effet, l'injection de cytokines est

suffisante pour induire une psychopathologie (Meyer et al., 2005). En plus de la schizophrénie, la MIA pourrait aussi être un facteur de risque pour l'autisme et le retard mental (Miller et al., 2005 ; Rantakallio & von Wendt, 1985). Les mécanismes par lesquels ces troubles neurodéveloppementaux apparaissent restent inconnus, mais de plus en plus de preuves suggèrent une association avec le dysfonctionnement microglial. En outre, l'incidence de nombreuses neuropathologies est sexuellement différenciée. Par exemple, le trouble du spectre autistique (TSA) touche 4 fois plus d'hommes que de femmes (Hanamsagar & Bilbo, 2016). Et cette différence peut être due en partie au dimorphisme sexuel de la microglie (Werling et al., 2016). Un second exemple est l'exposition à un stress prénatal. Les résultats révèlent que le stress prénatal modifie le développement et la distribution de la microglie dans le cerveau. Le nombre de microglies immatures a été réduit et la différenciation en une forme ramifiée a été accélérée (Gómez-González & Escobar, 2010).

La microglie est aussi impliquée dans la sclérose en plaques. Sa forme activée sécrète des molécules pro-inflammatoires qui sont associées à la démyélinisation et la neurodégénérescence (Zrzavy et al., 2017). D'ailleurs, les femmes sont 3 fois plus susceptibles de développer une maladie auto-immune que les hommes (Nissen, 2017). Les femmes développeraient la sclérose en plaques peu de temps après la puberté, alors que pour les hommes, ce serait plutôt vers 30-40 ans, âges auxquelles les taux sériques de testostérone diminuent (Gray et al., 1991 ; Tenover et al., 1987). De plus, il a été notifié que chez 24% des hommes atteints de la sclérose en plaques, leur taux de testostérone était inférieur à la moyenne des hommes du même âge (Wei & Lightman, 1997). Et de manière intéressante, les femmes sont protégées par les hormones de grossesse. De nombreuses preuves montrent une forte association entre l'état de grossesse et la protection de la maladie (Voskuhl, 2011). Ce qui prouve l'intérêt de considérer une pathologie selon le sexe.