



HAL
open science

Impact d'un épisode ischémique sur la glie de Bergmann

Romain Helleringer

► **To cite this version:**

Romain Helleringer. Impact d'un épisode ischémique sur la glie de Bergmann. Neurobiologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS162 . tel-01424166

HAL Id: tel-01424166

<https://theses.hal.science/tel-01424166>

Submitted on 2 Jan 2017

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

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

NNT : 2015SACLS162

THÈSE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY
PRÉPARÉE À
L'UNIVERSITÉ PARIS SUD

Ecole Doctorale n°568 : BIOSIGNE

Signalisations et réseaux intégratifs en biologie

Specialité : Sciences de la vie et de la santé

Par

Romain HELLERINGER

**IMPACT D'UN ÉPISODE ISCHÉMIQUE
SUR LA GLIE DE BERGMANN**

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 2 décembre 2015 :

Composition du Jury :

Oliver Nüsse, Professeur, Université Paris-Sud, Président du jury

Cendra AGULHON, Chargée de Recherche, Université Paris Descartes, Rapporteur

Mariano CASADO, Maître de Conférences, ENS Paris, Rapporteur

Carole ESCARTIN, Chargée de Recherche, CEA MIRCEN, Examineur

Christian GIAUME, Directeur de Recherche, Collège de France, Examineur

Armelle RANCILLAC, Chargée de Recherche, Collège de France, Examineur

Micaela GALANTE, Maître de Conférences, Université Paris Sud, Directeur de thèse

Hervé DANIEL, Professeur, Université Paris Sud, Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je pensais que ce chapitre serait le plus facile à écrire une fois le manuscrit terminé, et bien je me trompais... Pas de référence bibliographique, pas de littérature à laquelle se raccrocher... rien... Seul devant cette page blanche à me remémorer l'ensemble des personnes qui ont, de près ou de loin contribué à cette belle aventure. Je m'excuse par avance si le nom de certaine personne n'apparaît pas dans ce chapitre, c'est difficile de citer tout le monde, mais chaque personne a eu son importance...

Pour commencer, je remercie sincèrement l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Merci à Cendra Agulhon et Mariano Casado d'avoir consacré du temps pour tenir le rôle de rapporteur, ainsi que Carole Escartin, Christian Giaume et Armelle Rancillac pour avoir examiné mon travail. Sans oublier Oliver Nüsse qui a tout de suite accepté de présider ce jury.

Je remercie également l'ensemble du personnel du bâtiment 430 qui me croise et me recroise encore et toujours dans ce lieu un peu vétuste mais auquel on s'attache finalement...

Une pensée notamment pour Amel avec qui j'ai toujours pu discuter de tout ! J'espère avoir réussi à te soutenir pendant ta thèse comme toi tu l'as fait pour moi...

Une pensée également pour Marie-Hélène (toujours pétillante et que je n'oublie pas malgré son changement de bâtiment), Hélène, Rodolphe, Dimitri (le rugbyman thésard), l'équipe des chimistes (parfois un peu bruyante le midi mais fort sympathique), Jean (et son fameux « ça va mec ? »), Virginie et tout ceux que je ne cite pas ici...

Je n'oublie pas non plus l'ensemble de l'équipe enseignante de physiologie animale au sein de laquelle j'ai passé de très bons moments :

Laurence, qui fait sentir à tous les étudiants qu'ils sont uniques, qui me connaît depuis la L2 et qui m'a vu grandir (et mûrir aussi je l'espère) au cours de ma scolarité, jusqu'à ce qu'on devienne collègue pendant mon monitorat. Ne changes pas, tous les étudiants t'adorent.

Steve, mon formateur de TP6, pour tous ces bons moments passés, à la fac comme en dehors.

Alexandra, alias l'inspecteur Alex, toujours à vouloir être au courant de tout mais c'est comme ça qu'on l'aime !

Quentin (toujours la répartie bien placée pour mettre l'ambiance en soirée), Laura (la copine de promo, et de Bilbao !!!), Pierre-Louis (alias Pilou), Amina (la p'tite fille du sud et son accent qui chante)...

Même si elles ne faisaient pas partie de l'équipe enseignante, une pensée pour les copines de promo Charlotte et Elsa (« Salut toi... ») qui étaient là pour les soirées entre doctorants et les soirées de l'école doctorale.

Je souhaite également que Laurent apparaisse dans ce chapitre, notre secrétaire de l'école doctorale qui nous aide en permanence dans toutes les démarches administratives de l'école doctorale et de l'université. Merci pour ta disponibilité, ta bonne humeur et ton soutien !

Je remercie aussi Cyrille, notre collaborateur, qui m'a appris à manipuler les souris et avec qui il a toujours été agréable de travailler.

Une pensée également aux « hommes forts » de la salle de sport, Yohann, Victor, Adrien et tous les autres qui m'ont permis de bien décompresser après certaines journées de manip ratées...

Last but not least, je veux également remercier l'ensemble de l'équipe d'Hervé Daniel, pour cette intégration facile et plus particulièrement :

Hervé, le grand chef, présent au laboratoire avant tout le monde et après tout le monde, toujours disponible pour discuter, merci d'avoir été présent.

Heather merci pour ces bons moments passés ensemble et ces déjeuners autour de discussions animées sur tout et n'importe quoi ! Il faudra quand même qu'on s'organise une soirée devant un match de « Hockyyyy » avec un bon « Cordon bleu » dans l'assiette!!!

Simon, un plaisir de partager le bureau avec toi. Que de bons moments passés, à la fois pendant l'enseignement, au labo, et même en congrès à Montpellier. Il ne restera que des bons souvenirs. Et tu devras même me supporter encore quelques temps au labo !!

Micaela, difficile de résumer ces années ensemble en quelques mots... Faire cette thèse sous ta direction a réellement été un plaisir. Beaucoup de doctorants seraient jaloux de l'encadrement dont j'ai bénéficié. Toujours présente mais également à l'écoute de mes idées, ma thèse s'est déroulée dans un esprit d'échange très équilibré. Scientifiquement et humainement, cette complicité aura permis de m'épanouir au cours de ma thèse. Au delà des mots, la suite de l'aventure, dès janvier, prouve que nous avons mutuellement envie de continuer ce travail d'équipe. Une pensée également pour Marco, Maïa et Amanda qui ont gentiment accepté de te partager un peu plus ces derniers mois pour qu'on puisse finir notre projet. Pour tes enseignements, tes encouragements, ta confiance en moi, et tout ce que l'on a partagé, MERCI.

J'arrive au terme de ce chapitre que je choisis de conclure par le plus important à mes yeux, même si c'est peut être un peu cliché... Je remercie celle sans qui je ne pense pas que tout ça aurait été possible, celle qui a toujours cru en moi et qui m'a toujours soutenu quoi qu'il arrive même si cette thèse est bien loin de tes centres d'intérêts...

Maman, je te dédie cette thèse.

*"Pour marcher au pas,
Un cerveau est inutile.
Le cervelet est largement suffisant."
A. Einstein*

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
SOMMAIRE	4
TABLE DES FIGURES.....	7
LISTE DES TABLEAUX.....	10
LISTE DES ABRÉVIATIONS	11
INTRODUCTION.....	13
I. L'ISCHÉMIE CÉRÉBRALE.....	13
1. <i>Définition</i>	13
2. <i>Epidémiologie</i>	13
3. <i>Facteurs de risque</i>	14
a. Facteurs de risque non modifiables :	14
b. Facteurs de risque modifiables :	15
4. <i>Symptômes cliniques de l'AVC</i>	15
5. <i>Physiopathologie de l'ischémie</i>	17
6. <i>Mécanismes cellulaires</i>	19
a. Baisse d'énergie métabolique	21
b. Excitotoxicité	21
c. Stress oxydant	23
d. L'œdème cérébral	24
i. Œdème cytotoxique.....	26
ii. Œdème vasogénique.....	26
e. Inflammation post-ischémique.....	27
f. Apoptose	28
7. <i>Traitement de l'AVC</i>	29
8. <i>Modèles d'ischémie</i>	30
a. Modèles in vivo.....	31
i. Occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAO)	31
ii. Photothrombose :.....	31
iii. Ischémie induite par l'endothéline-1 :	32
b. Modèles in vitro	32
i. Oxygen and glucose deprivation (OGD):.....	32
ii. Ischémie chimique :	33
iii. Effets excitotoxiques du glutamate :	33
9. <i>Limites des modèles</i>	33
II. LES ASTROCYTES	36
1. <i>Introduction</i>	36

2.	<i>Hétérogénéité astrocytaire</i>	38
3.	<i>Organisation cytoarchitectonique</i>	39
4.	<i>Calcium astrocytaire</i>	41
5.	<i>Fonctions astrocytaire de base</i>	43
a.	Support métabolique	43
b.	Régulation du flux sanguin par les astrocytes.....	45
c.	Homéostasie potassique	46
d.	Homéostasie hydrique.....	48
e.	Recapture des neurotransmetteurs à la synapse	49
6.	<i>Gliotransmetteurs</i>	51
7.	<i>Synapse tripartite</i>	54
8.	<i>Astrocytes en conditions pathologiques</i>	56
9.	<i>Réponses astrocytaires à l'ischémie</i>	57
III.	ISCHÉMIE CÉRÉBELLEUSE	61
1.	<i>Epidémiologie de l'ischémie cérébelleuse</i>	61
2.	<i>Etudes réalisées chez l'homme</i>	61
3.	<i>Travaux effectués sur le cervelet</i>	63
a.	Réponse de la cellule de Purkinje à l'ischémie.....	64
b.	Phénomène du swelling	65
c.	Diversité des résultats	65
IV.	GLIE DE BERGMANN	66
1.	<i>Introduction</i>	66
2.	<i>Principales fonctions des cellules de Bergmann</i>	70
3.	<i>Calcium dans les cellules de Bergmann</i>	73
	MATÉRIELS ET MÉTHODES	74
1.	<i>Animaux</i>	74
2.	<i>Réalisation des tranches de cervelet</i>	74
3.	<i>Enregistrement électrophysiologique en patch clamp</i>	74
4.	<i>Ischémie in vitro : modèle 'Oxygen and Glucose Deprivation' (OGD)</i> 76	
5.	<i>Imagerie calcique : mesures dynamiques des variations de calcium</i>	76
6.	<i>Difficulté technique</i>	77
7.	<i>Quantification du « swelling »</i>	79
8.	<i>Enregistrement des concentrations de K⁺ extracellulaire</i>	80
9.	<i>Outils pharmacologiques</i>	81
10.	<i>Analyse statistique</i>	82
	RÉSULTATS	83
1.	<i>Contexte initial de mon projet de thèse</i>	83

2. <i>Présentation de l'article</i>	84
3. <i>Article</i>	86
4. <i>Expériences à température ambiante</i>	109
a. Effet sur le courant induit par l'OGD	109
a. Effet sur la montée calcique induite par l'OGD	111
a. Quantification du swelling	111
b. Implication putative des récepteurs P2X7 dans la réponse à l'OGD.....	113
i. Implication dans le courant induit par l'OGD.....	113
ii. Implication dans la montée de Ca ²⁺ cytosolique	114
iii. Implication dans le swelling.....	117
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	118
1. <i>Avant propos</i>	118
2. <i>Réponse électrophysiologique de la glie de Bergmann à l'OGD</i>	119
a. Augmentation de K ⁺ extracellulaire.....	119
b. Inhibition des conductances potassiques	120
c. Autres acteurs intervenant dans I _{OGD} de la cellule de Bergmann	121
d. Les récepteurs du glutamate ne sont pas impliqués dans la dépolarisation de la cellule de Bergmann.....	122
3. <i>Réponse calcique de la glie de Bergmann à l'OGD</i>	123
a. Phase précoce de la montée calcique	123
b. Phase tardive de la montée calcique	123
4. <i>Différences observées au cours de l'OGD à température ambiante (21-23°C) par rapport à une température plus proche des conditions physiologiques (31-33°C).</i>	124
a. Cinétique de la réponse OGD	124
b. Activation des récepteurs P2X7	125
5. <i>Rôles de la glie de Bergmann dans l'ischémie</i>	126
6. <i>Inhibition du métabolisme gliale</i>	128
7. <i>Perspectives</i>	130
a. Conditions physiologiques.....	130
b. Conditions pathologiques : modèle murin déficient en dystrophine de type Dp71	
131	
BIBLIOGRAPHIE	133

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Illustration d'un AVC ischémique et d'un AVC hémorragique.....	13
Figure 2 : Campagne de prévention américaine pour réagir de façon appropriée face à une personne atteinte d'un AVC (American Stroke Association)	17
Figure 3 : Evolution de la zone de pénombre et du cœur de la lésion en fonction du temps (d'après Kunz et al., 2010).....	18
Figure 4 : Illustration de la circulation collatérale	19
Figure 5 : Cinétique des mécanismes physiopathologiques de l'ischémie et principales approches pharmacologiques (d'après Bordet et al., 2009).....	20
Figure 6 : Excitotoxicité du glutamate au cours de l'ischémie	22
Figure 7 : Principaux mécanismes de régulation du calcium (d'après Kristian et Siesjö., 1998)	23
Figure 8 : Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique et illustration de l'œdème cytotoxique et vasogénique.....	25
Figure 9 : Cascades de signalisation apoptotique après une ischémie cérébrale (d'après Broughton et al., 2009)	28
Figure 10 : Intégrations des principales fonctions astrocytaires (d'après Maragakis et Rothstein, 2006)	37
Figure 11 : Illustration de la diversité astrocytaire	39
Figure 12 : Territoire astrocytaire	40
Figure 13 : Organisation du syncytium astrocytaire et représentation des jonctions communicantes.....	41
Figure 14 : Cascade de signalisation calcique dans les astrocytes	43
Figure 15 : Représentation de l'astrocyte au sein du réseau cérébral	45
Figure 16 : Transport astrocytaire du K^+	46
Figure 17 : Exemple d'augmentation de K^+ extracellulaire suite à une stimulation électrique	47
Figure 18 : Illustration du changement de volume astrocytaire au cours de l'activité neuronale.....	49
Figure 19 : Modèle de recapture et de recyclage du glutamate par les astrocytes	50
Figure 20 : Illustration de certains effets des gliotransmetteurs libérés par les astrocytes ...	53

Figure 21 : Communication bidirectionnelle entre astrocyte et neurones.....	55
Figure 22 : Rétractation astrocytaire impliqué dans la plasticité synaptique au niveau du noyau supra optique de l'hypothalamus (SON).....	56
Figure 23 : Représentation schématique des facteurs astrocytaires impliqués dans la réponse à l'ischémie au niveau de la zone de pénombre.....	58
Figure 24 : Illustration schématique des interactions possibles entre les astrocytes au cours de l'ischémie.....	60
Figure 25 : Comparaison anatomique du cervelet avant et après un AVC. (d'après Edlow et al., 2008).....	62
Figure 26 : Représentation de la vascularisation cérébelleuse normale.....	63
Figure 27 : Visualisation de la cellule de Bergmann au sein du cortex cérébelleux.....	66
Figure 28 : Représentation schématique du positionnement des cellules de Bergmann autour d'une cellule de Purkinje.....	67
Figure 29 : Visualisation de la cellule de Bergmann au contact de la synapse fibre grimpeuse-cellule de Purkinje.....	68
Figure 30 : Visualisation d'une cellule de Bergmann et d'une cellule de Purkinje du cortex cérébelleux.....	69
Figure 31 : Représentation de l'interaction cellule de Bergmann - fibre parallèle – cellule de Purkinje.....	72
Figure 32 : Exemple d'un enregistrement en imagerie calcique dont l'analyse est rendue impossible par le phénomène du « swelling » qui accompagne l'OGD.....	78
Figure 33 : Représentation schématique de la quantification de la lumière transmise au cours du phénomène de swelling. (d'après Allen et al., 2004).....	79
Figure 34 : Potentiel de Nernst pour le K^+	81
Figure 35 : La réponse à l'OGD est retardée lorsque la température est diminuée.....	110
Figure 36 : Variation de calcium cytosolique dans la cellule de Bergmann en réponse à l'OGD dans deux conditions de température.....	112
Figure 37 : Variation du swelling au cours de l'OGD.....	113
Figure 38 : Implication des récepteurs P2X7 dans le courant induit par l'OGD sur les cellules de Bergmann à température ambiante.....	115
Figure 39 : L'inhibition des récepteurs P2X7 permet de réduire la montée de calcium cytosolique au cours de l'OGD.....	116
Figure 40 : Réduction du phénomène du swelling par le blocage des récepteurs P2X7.....	117
Figure 41 : Les ectonucléotidases, enzymes de dégradation de l'ATP et de ces dérivés.....	126

Figure 42 : Visualisation des cellules de Bergmann 128

Figure 43 : Effet du fluorocitrate sur la $[K^+]_e$ et le courant de la cellule de Purkinje 129

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Principaux symptômes d'un AVC.....</i>	<i>16</i>
<i>Tableau 2 : Explications potentielles de l'échec des traitements lors des essais cliniques. (Adapté de Sutherland et al., 2012).....</i>	<i>34</i>
<i>Tableau 3 : Composition des solutions extracellulaires.....</i>	<i>75</i>
<i>Tableau 4 : Composition des solutions intracellulaires</i>	<i>76</i>

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA: Acide Arachidonique	Gln: glutamine
ADN : Acide désoxyribonucléique	GLT: Glutamate transporter
ADP: Adénosine di-phosphate	Glu: Glutamate
AICA: artère cérébelleuse antérieur inférieur	GLUT: Glucose transporter
ALDH1L1: Aldehyde Deshydrogenase 1	GMPC: Guanosine MonoPhosphate cyclique
AMPA: α -Amino-3-hydroxylo-5-Méthyl-isoxazole-4Propionic Acid	GPCP: G Protein Coupled Receptor
AMPC: Adénosine MonoPhosphate cyclique	GS: Glutamine transferase
AQP4: Aquaporine 4	ICAM1: Intercellular Adhesion Molecule 1
ASA: American Stroke Association	IL1- β : Interleukine-1 beta
ATP: Adénosine Triphosphate	IL6: Interleukine 6
AVC : Accident Vasculaire Cérébral	IP3 (InsP3): Inositol-1,4,5-trisPhosphate
BDNF: brain-derived neurotrophic factor	IRM : Imagerie à Résonance Magnétique
BG : Bergmann Glia	ISM: Ion-Sensitive Microelectrode
BHE : Barrière Hémato-Encéphalique	Kir: Canal K ⁺ inward rectified
CBP: Calcium Binding Protein	LTD : Dépression à long terme
Cx: Connexine	LTP: Potentialisation à long terme
Da: Dalton	MCAO : Occlusion de l'artère cérébrale moyenne
DAG: DiAcylGlycérol	MMP-9: Métalloprotéinase matricielle 9
EAATs: Excitatory amino acid transporters	NCX: Sodium/Calcium Exchanger
EETs: Acide Epoxyeicosatrienoics	NF- κ B: nuclear factor-kappa B
GABA: acide γ -aminobutyrique	NKCC: Na-K-Cl cotransporter
GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein	NMDA : N-Méthyl-D-Aspartate
GLAST: GLutamate ASpartate Transporter	OGD: Oxygen and Glucose Deprivation
	OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PC : Purkinje cell

PF : Parallele Fiber

PGE2: Prostagladine E2

PICA: Artère cérébelleuse postérieur
inférieur

PIP2: phosphatidylinositol-4,5-diphosphate

PKC: Protéine Kinase C

PLC: Phospholipase C

PMCA: Plasma Membrane Calcium
ATPase

ROS: Reactive Oxygen Species

rt-Pa : Activateur tissulaire du
plasminogène recombinant

SCA: Artère cérébelleuse supérieur

SERCA: Sarco/Endoplasmic Reticulum
Calcium ATPase

SOCC: Stored Operated Calcium Channel

SOCE: Stored Operated Calcium Entry

SON: Supra Optique Nuclei

TEP : Tomographie par Emission de
Positon

TMA: TetraméthylAmonium

TNF α : Tumor necrosis factor α

TTX: tétrodotoxine

VRAC: Volume Regulated Anion
Channels

INTRODUCTION

I. L'ischémie cérébrale

1. Définition

L'ischémie cérébrale est consécutive à l'interruption de la circulation sanguine dans le cerveau. Cela peut résulter d'un arrêt cardiaque temporaire qui induit alors une ischémie globale du cerveau ; mais également d'un accident vasculaire cérébral (AVC) ou d'un traumatisme crânien, on parlera dans ce cas d'une ischémie focale. Dans plus de 80% des cas, on parlera d'AVC ischémique, résultant de l'occlusion d'une artère cérébrale, mais il existe également des AVC hémorragiques, faisant suite à la rupture d'un anévrisme (Figure 1). Dans les deux cas, la durée de l'ischémie et l'étendue des zones détériorées détermineront la gravité des répercussions cérébrales. Globalement, l'ischémie cérébrale entraîne une interruption ou une insuffisance de l'apport sanguin dans le cerveau, privant les cellules d'oxygène et de glucose.

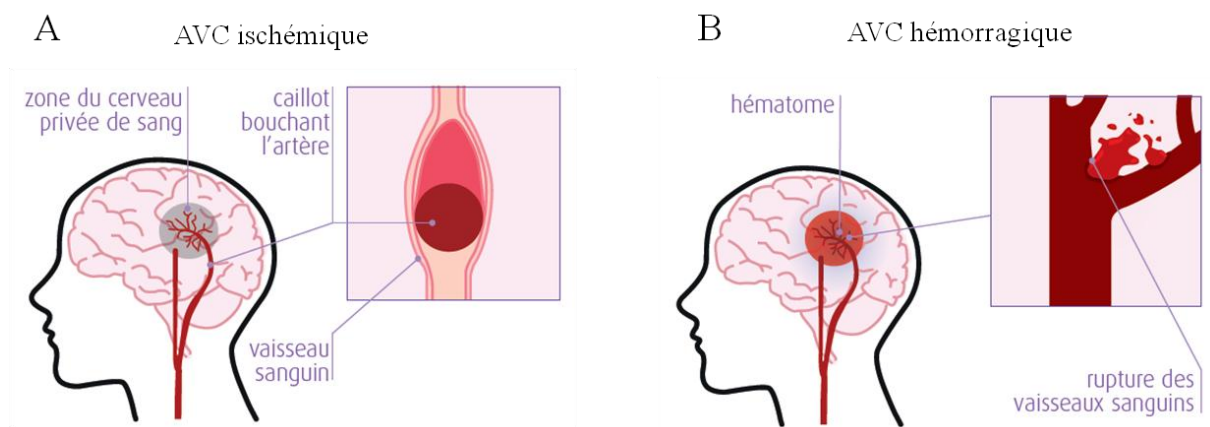


Figure 1 : Illustration d'un AVC ischémique et d'un AVC hémorragique

- A. AVC ischémique : l'occlusion d'une artère ou d'une artériole par un caillot entraîne la privation de sang d'une zone du cerveau
- B. AVC hémorragique : la rupture d'un vaisseau sanguin crée une hémorragie cérébrale conduisant à un hématome (d'après AVC France, www.Franceavc.com)

2. Epidémiologie

L'ischémie cérébrale constitue l'un des principaux problèmes de santé publique dans les pays industrialisés. En effet, il s'agit de la deuxième cause de mortalité mondiale (Kunz et al.,

2010). En France, on parle d'une incidence de 130000 nouveaux cas par an, soit environ 360 personnes par jour victimes d'un AVC (Leys et al, 2008). Au niveau mondial, on dénombre 16 millions de nouveaux cas chaque année, responsables de près de 6 millions de décès (Strong et al., 2007). Malgré des disparités dans les résultats des différentes études, on estime que la mortalité, 1 mois après l'AVC, est de l'ordre de 10 à 30% (Béjot et al., 2009). Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), le bilan devrait continuer de s'alourdir avec le vieillissement de la population. A cette forte incidence, il faut également ajouter un taux de récurrence important, estimé à environ 10% après un an et allant jusqu'à 40% après 10 ans (Mohan et al., 2011). Les conséquences des AVC sont dans la majorité des cas dramatiques, comprenant des atteintes physiques et cognitives, ce qui fait de l'AVC, la 1^{ère} cause de handicap chez l'adulte. Environ ¾ des patients qui auront survécu à un AVC garderont des séquelles définitives, et 1/3 de ces patients deviendra dépendant tandis que 1/4 ne reprendra jamais d'activité professionnelle (Warlow et al., 2003 ; France AVC, www.franceavc.com). A cela s'ajoute un taux important de dépression (30 à 50% des sujets durant la 1^{ère} année), ce qui va compliquer encore plus la récupération chez ces patients (Pinoit et al., 2006).

3. Facteurs de risque

Il existe de nombreux facteurs de risque liés aux AVC qui peuvent être classés en deux catégories : les facteurs de risque non modifiables intrinsèques à l'individu et les facteurs de risque modifiables qui peuvent être contrôlés par l'individu, par son comportement, ou par traitement médicamenteux.

a. Facteurs de risque non modifiables :

Les AVC touchent plus généralement les populations âgées. En effet, après 55 ans, le risque d'AVC double à chaque décennie (Rothwell, 2005). Le genre semble également être un facteur de risque, l'incidence des AVC est plus élevée chez l'homme que chez la femme, même si le nombre de cas est supérieur chez la femme en raison de son espérance de vie plus longue. On peut également évoquer le risque lié au patrimoine génétique. Dans le cas d'un antécédent paternel ou maternel, le risque d'AVC est multiplié par deux, même si pour l'instant les facteurs génétiques ne sont pas encore très clairs. De plus, une étude américaine rapporte que l'incidence des AVC semble être deux fois plus importante chez des individus d'origine africaine et hispanique que chez les caucasiens, mais au delà de l'aspect génétique, des différences socio-économiques pourraient également en partie expliquer les différences observées (White et al., 2005).

b. Facteurs de risque modifiables :

L'hypertension artérielle est le plus important facteur de risque modifiable d'AVC. Plus la pression artérielle sera importante, plus le risque d'AVC augmentera, et cela indépendamment de l'âge du patient (Lewington et al., 2002).

Il a également été bien démontré que le diabète de type 2 augmente considérablement le risque d'AVC (Stegmayr et al., 1995). Cela représente donc un véritable défi dans le cadre de la prévention primaire des AVC. En effet, l'incidence de l'hypertension artérielle et du diabète de type 2 augmentant avec l'âge, traiter en amont ces pathologies pourrait diminuer le nombre d'AVC.

Le tabagisme est aussi un facteur augmentant le risque d'AVC même à faible dose, ceci impliquerait également le tabagisme passif (Bonita et al., 1999). On peut également citer parmi ces facteurs de risque, l'obésité, la contraception orale, la consommation excessive d'alcool, le cannabis, le syndrome d'apnées du sommeil ou même l'inactivité physique (Béjot et al., 2009 ; Goldstein et al., 2011).

4. Symptômes cliniques de l'AVC

Les signes cliniques de l'AVC peuvent être multiples, mais ne sont pas forcément tous retrouvés chez l'ensemble des patients, ce qui complexifie parfois le diagnostique. Le patient pourra présenter une perte de motricité de sévérité variable, allant d'une diminution de force dans un membre jusqu'à une paralysie de la moitié du corps, on parlera dans ce dernier cas d'hémiplégie. Des troubles de la parole sont également retrouvés, avec une difficulté à s'exprimer, à trouver ses mots, ceci chez certains patients. A cela peuvent s'ajouter des troubles de l'équilibre, des troubles visuels, des maux de têtes violents et soudain, pouvant aller jusqu'à des vomissements (tableau n°1).

Pris séparément, la plupart de ces symptômes peuvent évoquer d'autres pathologies, telles qu'une intoxication alimentaire, une migraine, un traumatisme crânien, ou même une tumeur au cerveau, ralentissant ainsi la prise en charge du patient, et donc son pronostic vital. Pour tenter de palier à ces problèmes, des campagnes de sensibilisation pour le grand public se sont mises en place, comme par exemple l'American Stroke Association (ASA) aux Etats Unis (Figure 2), ou le plan d'action national en France.

Tableau 1 : Principaux symptômes d'un AVC

Troubles moteurs	<ul style="list-style-type: none"> - Hémiplégie : perte de la motricité d'un côté du corps - Ataxie : trouble de la coordination - Dysphagie : difficulté à déglutir
Troubles sensoriels	<ul style="list-style-type: none"> - Paresthésie : troubles de la sensibilité tactile (fourmillements, picotements, engourdissements) - Hémiparésie : perte de force d'un côté du corps
Troubles visuels	<ul style="list-style-type: none"> - Hémianopsie latérale homonyme : perte de la moitié du champ visuel - Diplopie : vision double
Trouble du langage	<ul style="list-style-type: none"> - Aphasie : perte de la parole - Dysarthrie : trouble de l'articulation
Trouble cognitifs	<ul style="list-style-type: none"> - Perte de mémoire - Baisse de l'attention - Baisse de la concentration - Baisse de l'acuité mentale
Troubles émotionnels	<ul style="list-style-type: none"> - Perte de la maîtrise de soi - Dépression - Peur - Repli sur soi
Troubles physiologiques	<ul style="list-style-type: none"> - Céphalée - Nausée - Vomissements - Vertiges



Figure 2 : Campagne de prévention américaine pour réagir de façon appropriée face à une personne atteinte d'un AVC (American Stroke Association)

5. Physiopathologie de l'ischémie

L'un des problèmes principaux liés à l'ischémie réside dans le fait que les lésions cérébrales continuent de s'étendre au cours du temps, malgré un retour du débit sanguin cérébral à une valeur similaire à celle observée avant l'épisode ischémique. On distingue deux zones différentes : le cœur de l'ischémie, où le débit sanguin est le plus réduit et la pénombre de l'ischémie, où les dommages sont plus tardifs (Figure 3).

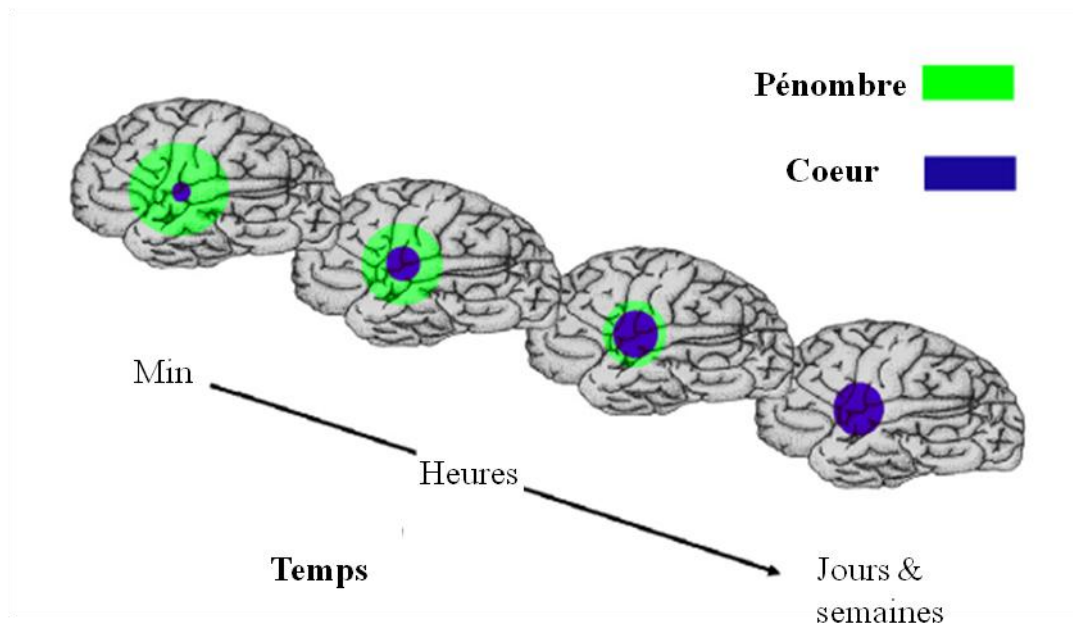


Figure 3 : Evolution de la zone de pénombre et du cœur de la lésion en fonction du temps (d'après Kunz et al., 2010)

- Le cœur de l'ischémie

Le débit sanguin cérébral normal chez l'adulte est en moyenne de 50 ml/100g/min (Deplanque, 2003). Au niveau du cœur de l'ischémie, le débit sanguin est défini comme inférieur à 12 ml/100g/min. On considère qu'au delà de 3 min dans ces conditions, les dommages seront irréversibles et la mort cellulaire très importante (Baron, 2009), on constatera alors une nécrose cellulaire, correspondant à la mort cellulaire non programmée et prématurée. D'un point de vue clinique, une fois la nécrose mise en place, la mort cellulaire est inévitable, et il n'existe pas de traitement capable de réduire ce phénomène. D'un point de vue thérapeutique, c'est donc sur la zone entourant le cœur de l'ischémie sur laquelle il va falloir se concentrer : la zone de pénombre.

- La pénombre de l'ischémie

La zone de pénombre est classiquement décrite comme une région où le débit sanguin est suffisamment réduit pour provoquer une hypoxie et dérégler les fonctions physiologiques, mais pas assez pour causer une diminution irréversible du métabolisme énergétique (Paciaroni et al., 2009 ; Heiss, 2011). Au sein de la zone de pénombre, le flux sanguin est réduit de façon moins sévère grâce aux collatérales des vaisseaux sanguins avoisinants. En effet, des vaisseaux sanguins plus fins présents dans la zone de pénombre permettent de limiter en partie, la diminution des apports sanguins (Figure 4). Des études ont évalué la réduction du flux sanguin cérébral dans la zone de pénombre, qui passe de 50 ml/100g/min à des valeurs comprises entre 12 et 22 ml/100g/min (Hakim et al., 1989).

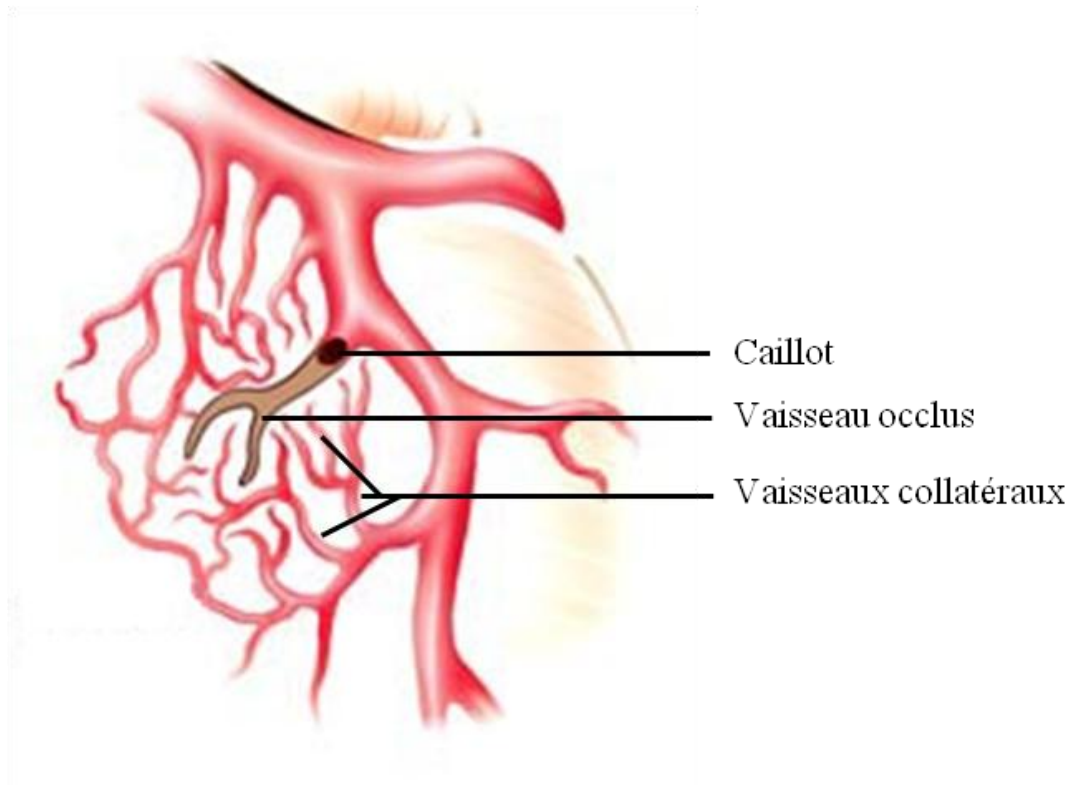


Figure 4 : Illustration de la circulation collatérale

Il est très important de pouvoir distinguer et localiser la zone de pénombre, puisqu'il s'agit de la partie du tissu qui pourrait potentiellement être sauvée. En effet, la pénombre ischémique est clairement une cible thérapeutique considérée comme très importante. La visualisation de la zone de pénombre de l'ischémie chez l'homme a beaucoup progressé, et même s'il n'existe pas encore de technique d'imagerie optimale, l'utilisation de la tomographie par émission de positon (TEP) ou l'imagerie à résonance magnétique (IRM), va permettre de mettre en place la meilleure stratégie thérapeutique possible (Donnan et al., 2002, Paciaroni et al., 2009). D'un point de vue fonctionnel chez des rats ayant subi une occlusion de l'artère cérébrale moyenne (voir chapitre I-8-a-1 de l'introduction), des mesures électrophysiologiques comme l'électroencéphalogramme et les potentiels évoqués montrent un silence électrique complet, qui peut être reversé si le débit sanguin est rétabli (Hossman, 1994).

6. Mécanismes cellulaires

D'un point de vue cellulaire, les effets pathogéniques induits pas l'ischémie sont multiples et complexes, on parle de « cascade ischémique ». Parmi ces effets, on peut citer une baisse d'énergie métabolique, une élévation de calcium intracellulaire, une forte dépolarisation membranaire, l'ensemble conduisant à une excitotoxicité importante. De plus, des mécanismes plus généraux avec une augmentation du stress oxydatif, une perturbation de la barrière hémato-encéphalique, la mise en place de l'inflammation et de processus apoptotiques peuvent également être mis en jeu (Figure 5).

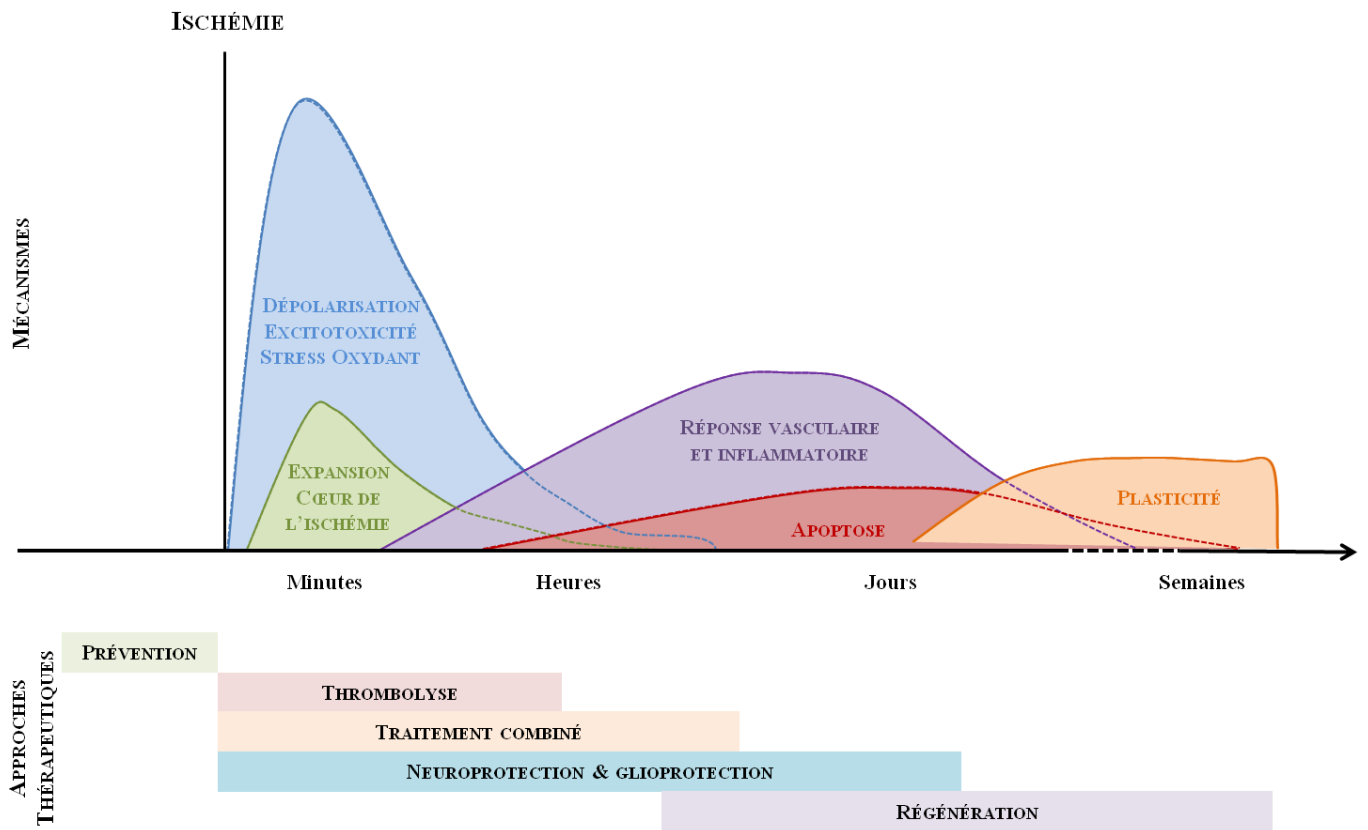


Figure 5 : Cinétique des mécanismes physiopathologiques de l'ischémie et principales approches pharmacologiques (d'après Bordet et al., 2009)

a. Baisse d'énergie métabolique

Le cerveau est l'organe qui consomme le plus d'énergie en rapport avec son poids, en moyenne il représente 2% de la masse corporelle et représente 20% des besoins énergétiques. Pour autant, les réserves énergétiques y sont quasiment inexistantes, en conséquence, l'apport constant de glucose et d'oxygène par le sang est fondamental. Lors d'une ischémie, la première conséquence de la réduction du flux sanguin est la diminution drastique d'oxygène et de glucose, qui conduit à la diminution d'ATP intracellulaire due à l'arrêt de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative. Cette chute de production d'énergie entraîne le dysfonctionnement des mécanismes ATP-dépendants, tels que l'activité de la pompe Na^+/K^+ -ATPase. Cela a pour conséquence une dysrégulation ionique dans les neurones, mais également dans les cellules gliales. En effet, le K^+ s'accumule dans le milieu extracellulaire alors que le Na^+ et le Ca^{2+} s'accumulent dans le milieu intracellulaire (Rossi et al., 2007). De plus, la diminution d'oxygène entraîne l'augmentation du lactate généré par glycolyse anaérobie, induisant ainsi une acidose du milieu intracellulaire pouvant générer des radicaux libres (Huang et al., 2004).

b. Excitotoxicité

Suite à la diminution de l'énergie métabolique disponible, les neurones se dépolarisent progressivement (Dirnagl et al., 1999), avec pour effet la libération massive de neurotransmetteurs comme le glutamate. Or, la régulation de la concentration de glutamate dans le milieu extracellulaire est assurée par l'activité des transporteurs du glutamate des neurones et des astrocytes. Ces transporteurs utilisent le gradient électrochimique du Na^+ et du K^+ pour recapturer le glutamate extracellulaire. Dans des conditions ischémiques, la dysrégulation ionique associée à la dépolarisation membranaire peut entraîner l'inversion des transporteurs du glutamate. Par conséquent, le glutamate s'accumule dans l'espace extracellulaire à la suite de sa libération vésiculaire par des fibres surexcitées, mais également, à la suite de l'inversion des transporteurs du glutamate (Nicholls et al., 1990 ; Rossi et al., 2000 ; Hamann et al., 2005). L'excès de glutamate extracellulaire conduit à une activation prolongée des récepteurs ionotropiques du glutamate de type AMPA/Kainate et NMDA. L'entrée de Ca^{2+} par les récepteurs NMDA peut induire une excitotoxicité en augmentant la production de radicaux libres, en activant des protéases, et en déclenchant des voies de signalisation conduisant à l'apoptose (Benquet, 2008). Bien que moins perméable au Ca^{2+} que les récepteurs NMDA, certains récepteurs AMPA peuvent laisser passer le calcium. En effet, les récepteurs AMPA n'exprimant pas la sous-unité GluR2 sont perméables au Ca^{2+} , et peuvent également contribuer au phénomène d'excitotoxicité (Figure 6 ; Noh et al., 2005). De plus, des expériences réalisées sur le modèle murin ont montré que les récepteurs AMPA deviennent plus perméable au Ca^{2+} suite à une ischémie, entraînant une augmentation des dommages (Pellegrini-Giampietro et al., 1992 ; Pellegrini-Giampietro et al., 1997).

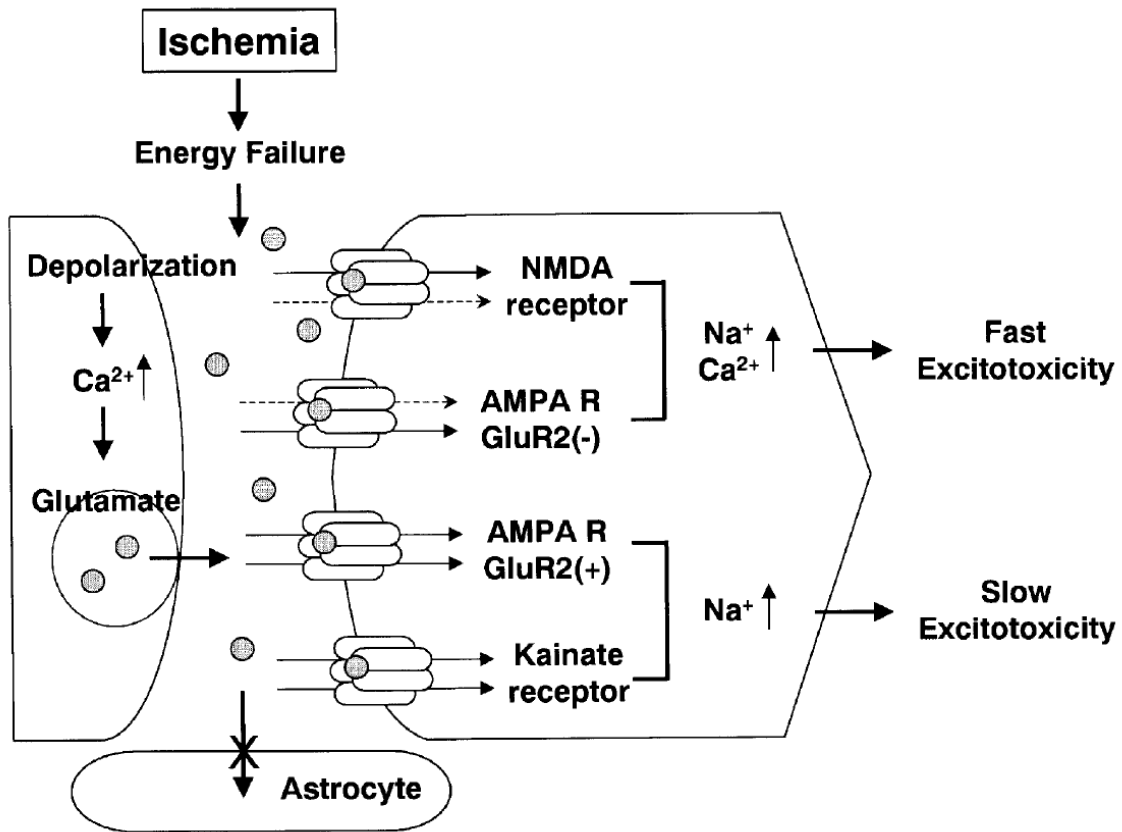


Figure 6 : Excitotoxicité du glutamate au cours de l'ischémie

L'excitotoxicité dite rapide sera principalement due à l'entrée importante de Ca^{2+} dans les cellules suite à l'activation des récepteur NMDA et AMPA (dépourvus de sous unité GluR2). En revanche, l'augmentation de Na^+ conduira principalement à une excitotoxicité dite lente en contribuant au phénomène de « swelling » cellulaire (d'après Won et al., 2002).

A l'entrée de Ca^{2+} par les récepteurs ionotropiques au glutamate, s'ajoute une défaillance des mécanismes de régulation de l'homéostasie du Ca^{2+} (pompes, échangeurs, transporteurs...) au cours de l'ischémie (Figure 7). Dans ces conditions, le Ca^{2+} induit des cascades enzymatiques délétères pour les cellules, aboutissant notamment à des dysfonctionnements mitochondriaux qui augmentent la synthèse de radicaux libres et qui, à terme, entraînent la mort des cellules (Bonde et al., 2005). De plus, l'influx ionique est suivi d'une entrée passive d'eau conduisant à un gonflement cellulaire, et donc à la mise en place d'un œdème cytotoxique (Brouns et al., 2009).

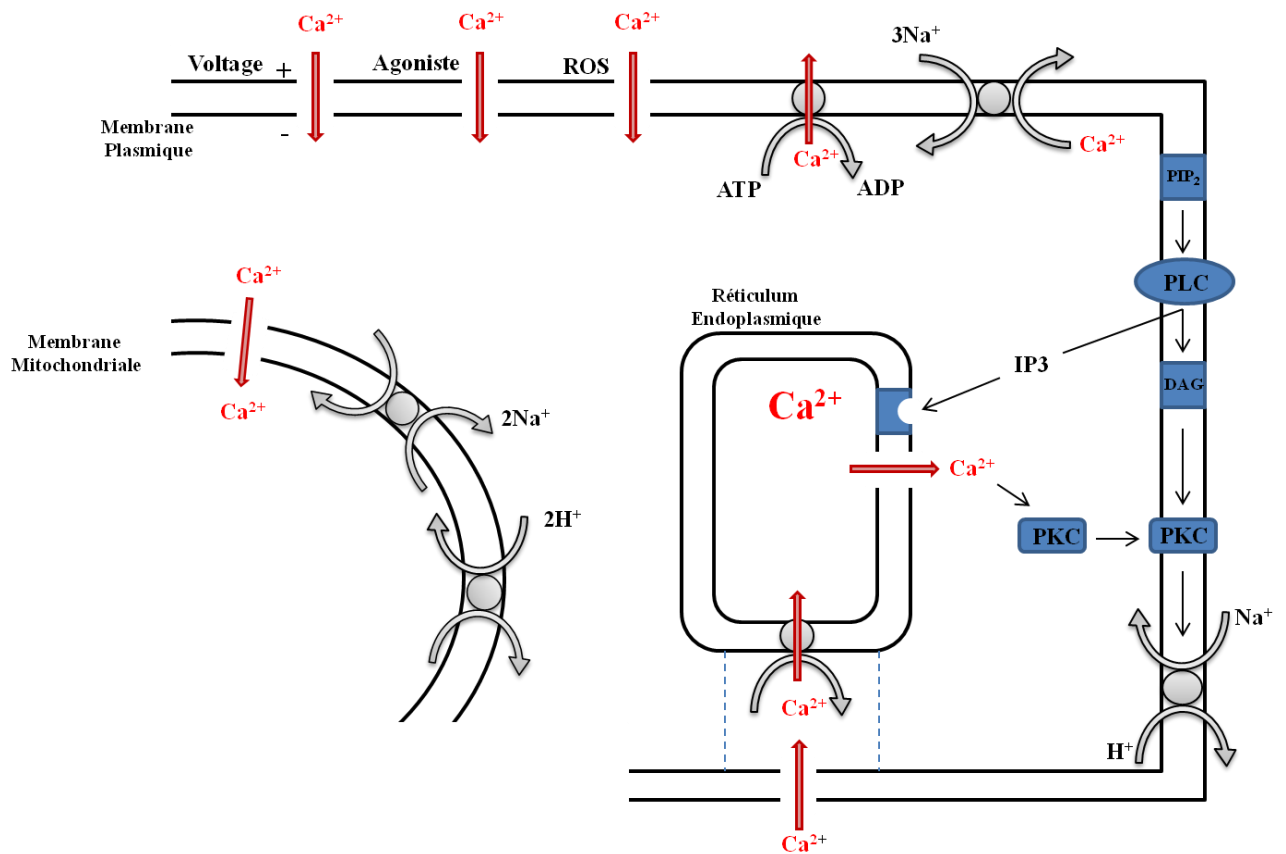


Figure 7 : Principaux mécanismes de régulation du calcium (d'après Kristian et Siesjö., 1998)

c. Stress oxydant

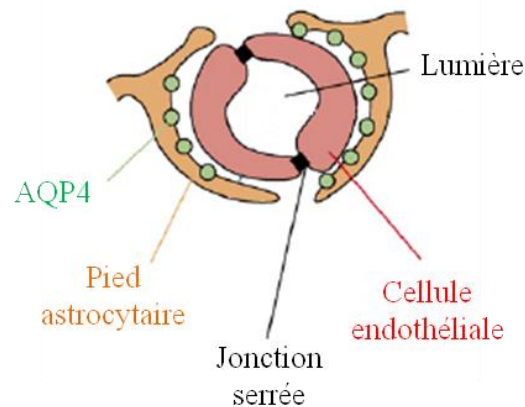
Le stress oxydant correspond aux réactions chimiques faisant intervenir des ROS (Reactive Oxygen Species) caractérisées par la présence d'un électron célibataire instable, et donc très réactif : on parle de radicaux libres. Au cours de l'ischémie, de nombreuses études montrent une forte production de radicaux libres, tels que l'anion superoxyde (O₂⁻), le monoxyde d'azote (NO), les radicaux hydroxyles (OH), ainsi que les peroxy-nitrites (ONOO), qui seront des médiateurs importants dans les lésions tissulaires induites par ce phénomène (Chan, 2001; Pradeep et al., 2012). Classiquement, les tissus peuvent se protéger contre les radicaux libres produits grâce à la présence de molécules anti-oxydantes, telles que le glutathion, les vitamines E et C et certaines enzymes comme la glutathion peroxydase ou la catalase. Or, en conditions pathologiques telles que l'ischémie, ces mécanismes de protection « anti-oxydant » sont dépassés, et les radicaux libres sont délétères au niveau cellulaire. Ceci, surtout dans la phase de reperfusion à la suite de l'ischémie due à l'apport d'oxygène en grande concentration. En effet, les radicaux libres ont des effets pléiotropes sur les tissus, avec notamment la peroxydation des lipides qui entraîne des dommages membranaires, la

dérégulation de processus de signalisation cellulaire, ainsi que des effets directs sur le génome, en modifiant l'expression de nombreux gènes (Durukan et al., 2007). De plus, les radicaux libres peuvent directement induire la mort cellulaire par nécrose ou bien, à plus long terme, par des mécanismes inflammatoires, induire l'apoptose (Evans et al., 2004). Finalement, le stress oxydatif semble également être un acteur tardif de la dérégulation de la barrière hémato-encéphalique (BHE), ceci par l'activation de métalloprotéases en partie responsables de sa perméabilisation quelques heures après l'ischémie (Brouns et al., 2009; Weiss et al., 2009).

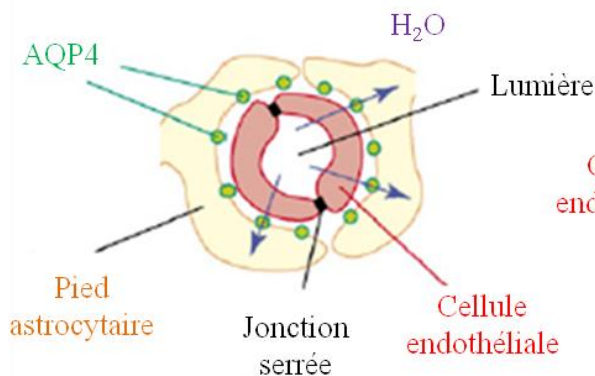
d. L'œdème cérébral

L'œdème cérébral consiste en une augmentation du volume des compartiments intracellulaires et extracellulaire du cerveau, ce qui se traduit, à terme, par une augmentation du volume cérébral. Chronologiquement, suite à l'ischémie, deux types d'œdèmes vont se mettre en place. On parle dans un premier temps d'œdème cytotoxique (Figure 8) qui correspond au gonflement cellulaire suite à l'entrée de molécules d'eau dans les cellules. Dans un deuxième temps, l'altération de la barrière hémato-encéphalique aboutit à l'entrée d'eau dans le cerveau par le système vasculaire défaillant, on parle d'œdème vasogénique (Figure 8). La rupture de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique est un phénomène critique pour la formation de l'œdème, mais également pour le risque de transformation hémorragique. En effet, l'œdème cérébral et la transformation hémorragique sont les deux causes principales de décès précoces des patients souffrant d'une attaque ischémique (Gasche et al., 2003).

A – BARRIÈRE HÉMATO-ENCÉPHALIQUE



B – ŒDÈME CYTOTOXIQUE



C – ŒDÈME VASOGÉNIQUE

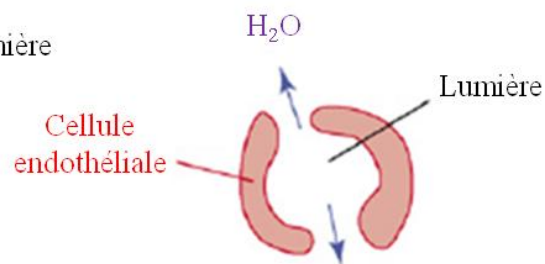


Figure 8 : Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique et illustration de l'œdème cytotoxique et vasogénique

- La barrière hémato-encéphalique est principalement formée par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins reliées par des jonctions serrées, par les pieds astrocytaires, ainsi qu'une lame basale protéique et des péricytes.
- Suite à une ischémie, on assiste à une entrée d'eau dans les astrocytes, induisant un gonflement des cellules, et notamment de leurs prolongements distaux, les pieds astrocytaires, on parle d'œdème cytotoxique.
- Dans une phase plus tardive, l'altération de la barrière hémato-encéphalique, notamment au niveau des jonctions serrées, va entraîner une entrée d'eau dans le parenchyme nerveux et causer un œdème vasogénique (D'après Tait et al., 2008).

i. Œdème cytotoxique

L'œdème cytotoxique est associé au dysfonctionnement des ATP-ases membranaires dans des conditions de baisse des apports énergétiques, caractéristiques de l'ischémie cérébrale. En effet, l'inhibition progressive des pompes ioniques, comme la Na^+/K^+ ATP-ase entraîne une dysrégulation des gradients électrochimiques pour divers ions. Ce déséquilibre est responsable d'une accumulation d'ion K^+ dans le milieu externe et de Na^+ et Ca^{2+} à l'intérieur des cellules (Unterberg 2004 ; Liang et al., 2007). De plus, l'accumulation de K^+ à l'extérieur augmente l'activité du transporteur $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$, induisant en conséquence une accumulation de ces ions dans le compartiment intracellulaire (Mac Aulay et al., 2004). Le gonflement cellulaire résulte principalement de l'augmentation de l'osmolarité intracellulaire qui, consécutivement, se traduit par une entrée d'eau dans les cellules (Mac Aulay et al., 2004 ; Liang et al., 2007). Ce phénomène est délétère pour les cellules, parce qu'il peut conduire à la lyse cellulaire. Cependant, l'œdème cytotoxique change très peu le volume du cerveau, car le gonflement des cellules est compensé par la réduction de l'espace extracellulaire. Tous les types cellulaires sont concernés par ce gonflement à la suite de l'ischémie, mais ils ne sont pas tous également affectés. Le gonflement neuronal est principalement dû à l'augmentation du Na^+ intracellulaire qui peut résulter d'une forte augmentation de la fréquence de décharge de potentiels d'action, ainsi que de l'activation importante des récepteurs ionotropiques glutamatergiques (Liang et al., 2007). Il semblerait que l'augmentation de Na^+ intracellulaire déclencherait secondairement une entrée importante de Cl^- , conduisant à la formation de l'œdème cytotoxique neuronal. En effet, de récentes expériences montrent que l'inhibition de ces transporteurs de Cl^- , fortement exprimés dans les neurones, permet de réduire de façon importante le gonflement neuronal (Rungta et al., 2015). Par ailleurs, étant donné leur rôle clé dans l'homéostasie ionique et hydrique (voir chapitre II-5-c & II-5-d de l'introduction), les astrocytes sont également largement touchés par l'œdème et restent gonflés 24h après l'ischémie, ceci pouvant entraîner une nécrose cellulaire (Heo et al., 2005). En effet, les astrocytes expriment des canaux pour l'eau, les aquaporines, dans des régions spécifiques de leur membrane à l'interface avec les milieux liquidiens (Figure 8), leur conférant ainsi un rôle stratégique dans l'équilibre hydrique (Benfenati et al., 2010). L'aquaporine 4 (AQP4) est la plus abondante et la plus exprimée dans le cerveau, on la retrouve principalement au niveau des pieds astrocytaires, en étroite interaction avec les vaisseaux sanguins, ce qui en fait une cible potentielle majeure dans le développement de l'œdème au cours de l'ischémie. En effet, sur des modèles de souris dépourvues d'AQP4 (AQP4^{-/-}), l'œdème semble être réduit après une ischémie *in vivo* (Manley et al., 2000). Des résultats similaires sont retrouvés chez des modèles de souris déficientes pour une protéine d'ancrage des AQP4 à la membrane, l' α -syntrophine qui présentent également une réduction de l'œdème cytotoxique (Amiry-Moghaddam et al., 2003).

ii. Œdème vasogénique

La barrière hémato-encéphalique est la zone d'interface entre le sang et le tissu cérébral, composée pour partie de cellules endothéliales qui forment entre elles des jonctions serrées, contrôlant ainsi finement les nombreux échanges entre le système vasculaire et le cerveau (Figure 8). Au cours de l'ischémie, la libération de molécules inflammatoires et de radicaux

libres va entraîner la rupture de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique. Ceci conduit à la formation de l'œdème vasogénique, l'influx de substances neurotoxiques et inflammatoires et probablement des complications hémorragiques. D'un point de vue mécanistique, les radicaux libres peuvent entraîner la libération par les neurones, les astrocytes et les cellules endothéliales, de métalloprotéases telles que MMP-9 qui dégraderaient la lame basale des cellules endothéliales et rendraient ainsi la barrière hémato-encéphalique perméable (Rivera et al., 2004 ; Heo et al., 2005). Ce phénomène a pour conséquence une fuite de fluides des vaisseaux sanguins vers le liquide céphalorachidien. L'eau va donc s'infiltrer du système vasculaire vers le parenchyme nerveux et causer l'œdème vasogénique, créant ainsi une forte augmentation du volume cérébral. Cette augmentation du volume du cerveau au sein de la boîte crânienne est la cause principale à des complications dues à l'œdème. Une étude récente montre une réduction de la taille de la lésion ischémique chez des souris AQP4^{-/-}, faisant ainsi d'AQP4 une cible thérapeutique potentielle (Yao et al., 2015). Au delà de l'œdème, dans une phase plus tardive, l'infiltration de cellules inflammatoires par la barrière hémato-encéphalique poreuse, va également contribuer à la réponse inflammatoire post-ischémique (Del Zoppo et al., 2000).

e. Inflammation post-ischémique

L'ischémie cérébrale est suivie par une forte réponse inflammatoire, des jours voire des semaines après, avec parfois détérioration des tissus, principalement dans la zone de pénombre, ceci jouant un rôle important dans les lésions cérébrales. De nombreux types cellulaires contribuent à la mise en place de cette inflammation. Dans un premier temps, les cellules astrocytaires sont activées par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et participent à la libération de facteurs inflammatoires, tels que les cytokines et les chémokines (Dong et al., 2001). De plus, les cellules microgliales activées vont progressivement se transformer en phagocytes et libérer encore plus de médiateurs pro-inflammatoires (Benakis et al., 2014). Parallèlement, même si les mécanismes ne sont pas encore complètement compris, les leucocytes vont infiltrer le parenchyme nerveux, via la barrière hémato-encéphalique perméabilisée et participer à cette forte réponse inflammatoire. D'un point de vue moléculaire, l'ischémie va entraîner l'activation de la synthèse de facteurs de transcription pro-inflammatoires, tel que le facteur nucléaire NF- κ B déclenchant l'expression de cytokines inflammatoires (Wang et al., 2007). Parmi ces cytokines, on retrouve l'expression de TNF- α , IL1- β , IL6, ou encore ICAM1 qui, à terme pourront enclencher les mécanismes d'apoptose (Rami et al. 2008). La réponse inflammatoire globale va être un acteur important des mécanismes apoptotiques intervenant pendant les jours qui suivent l'attaque ischémique (Dirnagl et al., 1999).

f. Apoptose

A plus long terme, la plupart des interactions décrites ci-dessus vont conduire au déclenchement de l'apoptose dans de nombreuses cellules, principalement dans les neurones de la zone de pénombre. L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée qui consomme de l'énergie, et qui pourra donc être potentialisé lors de la reperfusion et de la restauration de l'énergie cellulaire (Schaller et al., 2004). Dans le cas de l'ischémie, l'apoptose semble être induite par deux types de voies différentes : intrinsèque et extrinsèque (Figure 9).

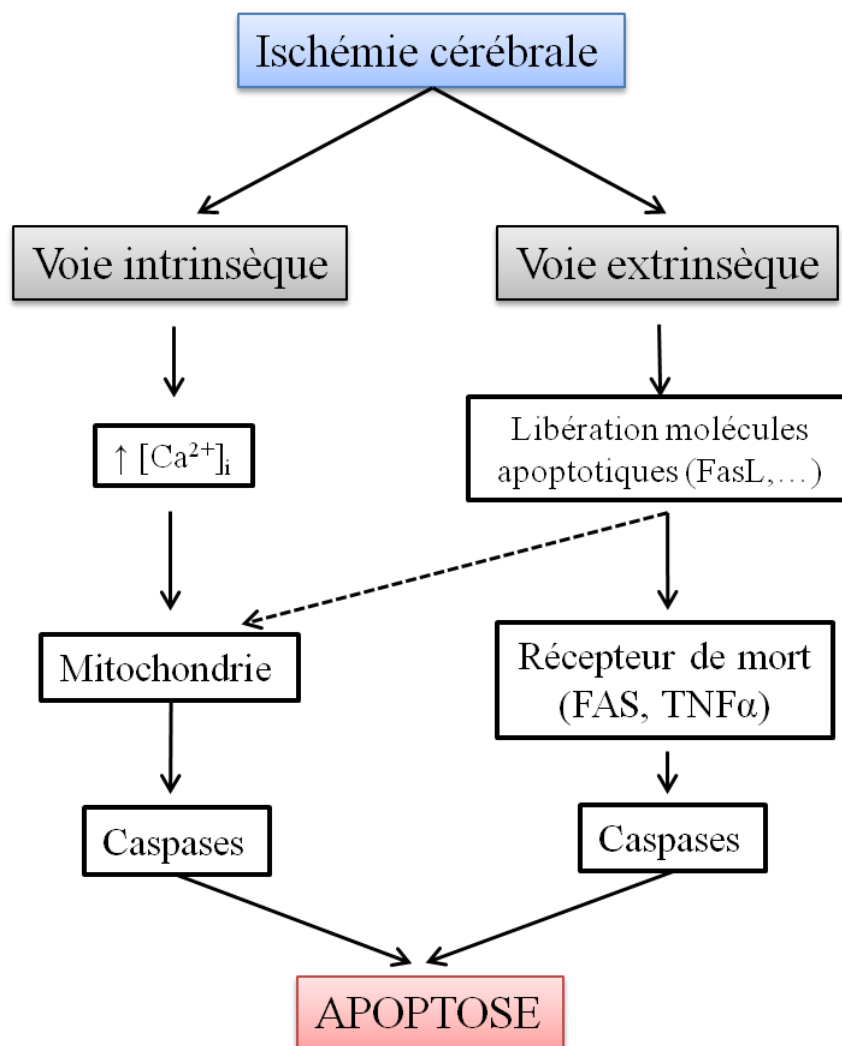


Figure 9 : Cascades de signalisation apoptotique après une ischémie cérébrale (d'après Broughton et al., 2009)

La voie intrinsèque est consécutive à la montée de Ca^{2+} intracellulaire au cours de l'ischémie qui peut conduire au relargage de cytochrome C par les mitochondries, activant ensuite les

caspases 3 jusqu'à la mort cellulaire. En revanche, la voie extrinsèque passe par la mise en jeu de 'récepteurs de mort' présents au niveau membranaire (récepteurs Fas, récepteurs TNF α), qui entraînent l'activation de la caspase 8 conduisant à la mort cellulaire (Broughton et al., 2009). D'un point de vue physiopathologique, l'apoptose demeure un avantage par rapport à la nécrose cellulaire, qui est fortement présente au niveau du cœur de l'ischémie. En effet, les cellules nécrotiques vont être lysées suite à l'effondrement du cytosquelette, libérant ainsi le contenu intracellulaire dans le milieu extracellulaire, ce qui peut être toxique pour le tissu environnant. En revanche, les cellules en apoptose, malgré des changements morphologiques importants, vont conserver l'intégrité de leur membrane plasmique formant des corps apoptotiques, pouvant rapidement être phagocytés sans induire de nouvelle réponse inflammatoire (Love, 2003). L'apoptose ne va pas toucher que les neurones, mais également les cellules gliales ou même les leucocytes présents dans la zone ischémisée (Broughton et al., 2009). La mort cellulaire programmée semble être donc une piste intéressante pour tenter de limiter les dommages cérébraux post-ischémiques, même si certains mécanismes ne sont pas encore bien connus, notamment concernant les cellules gliales.

7. Traitement de l'AVC

Ces dernières années, de nombreux progrès ont été réalisés dans la prise en charge des AVC. Néanmoins, malgré de nombreuses recherches, peu de solutions thérapeutiques sont disponibles (Bouleti et al., 2014). Le temps de prise en charge après énoncé du diagnostique va être un facteur déterminant dans le pronostic vital du patient. A l'heure actuelle, le seul traitement utilisé est la thrombolyse par l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant (rt-PA). Ce traitement vise à désagréger le caillot obstruant le vaisseau sanguin atteint, ainsi qu'à éviter la formation de nouveaux caillots. Il doit être administré idéalement dans les 3 heures après l'attaque ischémique et peut être prescrit jusqu'à 4 heures 30 après l'attaque (Baron, 2009). Au delà de ce délai, le risque d'une hémorragie intracrânienne devient trop important, et le traitement par le rt-PA augmenterait fortement ce risque (Ishrat et al., 2012). Ainsi, moins de 10% des patients peuvent bénéficier du traitement. L'aspirine évite, à elle seule, 9 décès pour 1000 patients traités en phase précoce de l'ischémie (Donnan et al., 2008, Hacke et al, 2008). Les effets secondaires étant rares, et compte tenu de son faible coût, le traitement par l'aspirine est recommandé, surtout quand celui avec le thrombolytique n'est plus indiqué. De plus, le traitement par l'aspirine est particulièrement recommandé chez des patients ayant déjà subi un AVC, ceci comme traitement préventif des récurrences, et pourrait présenter un aspect protecteur pour la zone de pénombre (De Cristobal et al., 2001). Enfin, les cliniciens peuvent également recourir à la craniotomie décompressive dans le cas d'œdème cérébral, afin de réduire l'augmentation de la pression intracrânienne (Franck, 1995).

Au vu des effets dramatiques de l'AVC, le panel de traitements possibles reste limité. Il est donc fondamental de trouver de nouvelles approches thérapeutiques. Différentes pistes ont été menées, sans pour autant obtenir des résultats optimaux (Bordet et al, 2009). Parmi celles-ci on peut citer d'une part, la stratégie de neuroprotection visant à empêcher la mort neuronale, qui a connu beaucoup d'échecs notamment lors du passage de la recherche fondamentale à la

recherche clinique (Ginsberg, 2008). D'autre part, l'inhibition de l'excitotoxicité suite à la libération massive de glutamate au cours de l'ischémie a été une autre cible intéressante pour les chercheurs. Les antagonistes des récepteurs ionotropiques au glutamate de type NMDA ont donné des résultats encourageants dans des modèles animaux d'ischémie cérébrales (Gee et al., 2006). Cependant, la plupart des essais cliniques utilisant ces antagonistes ont été abandonnés pour leur inefficacité ou leurs effets secondaires (Benquet et al., 2008). Enfin, une approche visant à limiter l'apoptose, en utilisant des composés pharmacologique inhibant les caspases, a également été tenté, en obtenant des résultats encore controversés (Chauvier et al., 2007). L'apoptose est un processus multifactoriel probablement trop complexe pour être une cible thérapeutique unique, nécessitant donc de trouver divers inhibiteurs plus spécifiques.

Au vu de ces différents échecs, il reste encore de nombreuses recherches à mener sur la physiopathologie de l'ischémie, et notamment sur l'unité neurovasculaire, ceci afin d'intégrer les rôles respectifs des différents partenaires, à savoir : l'endothélium, les astrocytes et les neurones (Del Zoppo, 2009). La recherche fondamentale doit s'appuyer sur différents modèles animaux, afin de tenter de mettre en lumière de nouvelles pistes thérapeutiques.

8. Modèles d'ischémie

Il existe de nombreux modèles d'ischémie, mais trouver un modèle « idéal » reste une utopie. Néanmoins, il est possible de dresser le portrait robot d'un modèle qui serait le plus adapté pour étudier l'ischémie cérébrale. Dans ce modèle, la technique utilisée pour mimer l'ischémie devrait être relativement simple et peu invasive, tout en générant des lésions de taille reproductible. Ces lésions ischémiques devraient entraîner une réponse physiopathologique correspondant à ce que l'on observe chez l'homme, tout en permettant de surveiller et de maintenir les paramètres physiologiques dans des conditions normales, et ce en ayant accès à des échantillons de cerveau pour faire des évaluations post-mortem histopathologiques, biochimiques ou de biologie moléculaire. Ceci, sans oublier un coût raisonnable, ainsi que des conditions d'éthique irréprochables (Durukan et Tatlisumak, 2007). L'ensemble de ces aspects sont difficiles à réunir sur un seul et même modèle animal. Aussi, il faut choisir le modèle le plus adapté pour répondre à une problématique donnée.

A l'heure actuelle, la plupart des recherches relatives à l'ischémie sont réalisées sur des petits animaux, tels que le rat et la souris. Les rongeurs présentent de nombreux avantages, à commencer par un faible coût et des autorisations éthiques plus faciles à obtenir que les travaux sur les primates. De plus, on retrouve de fortes similarités au niveau de la vascularisation cérébrale, de l'anatomie et de la physiologie entre l'humain et les modèles murins. Ces dernières années, la souris a été très utilisée grâce aux modifications génétiques facilement réalisables, qui permettent une approche intéressante pour comprendre les mécanismes physiopathologiques de l'ischémie au niveau moléculaire. Par la suite, en cas de résultats prometteurs obtenus chez le modèle murin, il faudra tenter de les reproduire chez le modèle primate, qui est bien évidemment beaucoup plus proche de l'homme en terme d'organisation cérébrale et surtout de comportement. Ceci, dans le but de lancer des essais

cliniques chez l'homme. Dans ce contexte, de nombreux modèles ont été développés, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, afin d'étudier différents aspects de cette pathologie.

a. Modèles in vivo

i. Occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAO)

L'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAO) est le modèle le plus utilisé pour mimer l'ischémie *in vivo*. En effet, cette technique est utilisée dans plus de 40% des études de neuroprotection faites au cours de l'ischémie (Canazza et al., 2014). Différentes approches peuvent être envisagées, nécessitant ou non une craniotomie, et pouvant être réalisées de façon intraluminale ou bien par des mécanismes extravasculaires. La MCAO intraluminale présente l'avantage d'être peu invasive, car ne nécessitant pas de craniotomie. Elle est couramment pratiquée sur les modèles murins. L'introduction d'un fil de nylon dans l'artère cérébrale permet d'y bloquer la circulation sanguine et provoque une ischémie permanente ou bien transitoire si le filament est retiré, permettant dans ce dernier cas d'étudier également les phénomènes de reperfusion. Cependant, chez les rongeurs, le volume de la lésion présente une forte variabilité en fonction du fond génétique, de l'âge de la souris, et du temps d'occlusion (McColl et al., 2004). Par ailleurs, Il existe également des protocoles de MCAO qui sont menés en extravasculaire, utilisant la ligature ou l'électro cautérisation pour générer l'occlusion de l'artère. Ces protocoles semblent présenter une plus grande reproductibilité dans la lésion ischémique, sûrement en liaison avec une plus grande précision chirurgicale (Canazza et al., 2014). En revanche, la craniotomie indispensable dans ce cas pour avoir un accès direct aux vaisseaux présente des effets délétères, comme une altération de la température du cerveau, de la pression intracrânienne, et de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. C'est pourquoi, en général la technique de MCAO intraluminale est plus souvent utilisée par la communauté scientifique (Braeuninger et al., 2009).

ii. Photothrombose :

La photothrombose est induite par une injection systémique d'un colorant photo-actif : le Rose Bengal est le plus souvent utilisé. L'exposition à la lumière verte (Kao et al., 2014) entraîne une agrégation entre le colorant et les plaquettes, conduisant à l'obstruction des vaisseaux sanguins. Cette technique est relativement simple et non invasive, à condition que la lumière puisse franchir le crâne. Elle possède également l'avantage de générer des lésions de taille et de localisation bien reproductible (Braeuninger et al., 2009). Cependant, une des limites de ce modèle concerne l'absence de mise en place de pénombre. En effet, quelques minutes après la photothrombose, un œdème vasogénique du à une affection directe de la barrière hémato-encéphalique se développe. Il ne s'agit donc pas d'un bon modèle pour étudier les effets de certaines drogues visant à préserver la zone de pénombre. En revanche, il

peut être utilisé pour tenter de répondre à des problématiques spécifiques, telles que tester des molécules visant la réparation neuronale (Durukan et al., 2007).

iii. Ischémie induite par l'endothéline-1 :

L'endothéline-1 est un neuropeptide sécrété par l'endothélium vasculaire agissant comme un puissant vasoconstricteur, qui pourra réduire de façon dose-dépendante le débit sanguin cérébral en étant appliqué localement au niveau du cerveau. Des applications en surface ou en profondeur dans le cerveau induisent des lésions ischémiques localisées, avec un œdème réduit. Par contre, l'endothéline-1 n'agit pas uniquement sur des récepteurs des cellules endothéliales, mais agit également sur les récepteurs à l'endothéline présents sur les neurones et les astrocytes. Dans la moelle épinière, par exemple, l'endothéline-1 génère une réaction astrocytaire (ou astrocytose) favorisant la croissance axonale après lésion, compliquant ainsi l'interprétation des résultats expérimentaux sur la réparation neuronale (Carmichael, 2005).

b. Modèles *in vitro*

Il existe également plusieurs protocoles pour étudier les effets cellulaires de l'ischémie réalisée sur des cellules en culture, des cultures organotypiques ou bien directement sur tranches de cerveau. Travailler *in vitro* présente de nombreux avantages, notamment l'accès direct au compartiment extracellulaire sans être bloqué par la barrière hémato-encéphalique, tout en étant capable de contrôler assez finement l'environnement ionique, métabolique ainsi que la température du tissu nerveux (Cimarosti et al., 2008). De plus, il s'agit d'excellentes préparations pour des études pharmacologiques, électrophysiologiques, immunologiques ou encore d'imagerie. A l'aide de ces différentes approches, il est possible d'étudier les mécanismes moléculaires de l'ischémie cérébrale.

i. Oxygen and glucose deprivation (OGD):

L'OGD est l'un des modèles d'ischémie le plus utilisé, qui mime les deux caractéristiques principales de l'ischémie, à savoir la privation d'oxygène et de glucose (Rossi et al., 2000 ; Cimarosti et al., 2008 ; Xie et al., 2008 ; Brady et al., 2010). Dans le protocole, le glucose et l'oxygène contenus dans le milieu extracellulaire sont remplacés respectivement par le sucrose et l'azote. Le sucrose est un disaccharide qui, une fois métabolisé au cours de la digestion, donnera une molécule de glucose et une molécule de fructose. Contrairement au glucose, les enzymes nécessaires à la digestion du sucrose n'étant pas présentes au niveau cérébral, il n'y est pas métabolisé, et donc pas utilisé comme source énergétique. En revanche, sa présence dans le milieu externe permet d'en garder l'osmolarité. Par ailleurs, l'azote est utilisé en lieu et place de l'oxygène. L'azote étant un gaz inerte à pression atmosphérique, il n'a pas d'effet direct sur les membranes cellulaires (Rostain et Balon, 2006). Avec ce type de protocole, il est possible de revenir après la perfusion avec un milieu dépourvu d'oxygène et de glucose, à une solution physiologique, ceci pour mimer la reperfusion observée *in vivo*.

Certains protocoles d'OGD prévoient l'ajout du iodoacétate, un bloquant de la glycolyse, qui rend la procédure plus drastique (Rossi et al., 2000 ; Hamann et al., 2005), mais ne permettant plus l'étude de la reperfusion.

ii. Ischémie chimique :

D'autres approches simulent l'ischémie par une inhibition directe du métabolisme oxydatif ainsi que la glycolyse, en utilisant notamment du cyanure de sodium et du 2-déoxyglucose. Le cyanure de sodium provoque une diminution rapide de l'ATP. Le 2-déoxyglucose n'étant pas métabolisable contrairement au glucose, ne peut donc pas être utilisé comme source énergétique. Ce protocole mime donc deux caractéristiques importantes de l'ischémie. Cette approche a été réalisée notamment sur des cellules en culture, afin d'étudier la libération de glutamate par les cellules granulaires du cervelet au cours de l'ischémie (Pocock et al., 1998). Néanmoins, ce protocole reste moins utilisé et les mécanismes d'action ne sont pas complètement décrits, et surtout il ne permet pas d'étudier la phase de reperfusion. En effet, malgré de nombreux lavages, il reste difficile d'arrêter l'action de ces substances.

iii. Effets excitotoxiques du glutamate :

Durant l'ischémie, la dérégulation de la physiologie cellulaire conduit à la libération de neurotransmetteurs et notamment à la libération de glutamate, pouvant ainsi conduire à une excitotoxicité. Il existe donc un modèle d'ischémie consistant à exposer le tissu nerveux à de fortes concentrations de glutamate, afin de créer une excitotoxicité importante. L'étude des mécanismes ioniques de la toxicité du glutamate est complexe à réaliser *in vivo*. Par conséquent, beaucoup d'études sont menées sur des cultures de neurones, des préparations organotypiques, ou bien sur tranche de cerveau (Lai et al., 2014). L'ajout de glutamate ne mime qu'une seule des nombreuses conséquences de l'ischémie, et cette stratégie expérimentale n'est donc pas adaptée pour comprendre les mécanismes généraux de la pathologie. Cependant, ce modèle a permis de répondre à des questions précises concernant le rôle spécifique des différents récepteurs au glutamate (Cimarosti et al., 2008). De nombreuses expériences réalisées dans les années 1980 ont permis de mettre en évidence le rôle fondamental du glutamate dans la mise en place de la mort neuronale au cours de l'ischémie, ainsi que de comprendre certains des mécanismes de neuroprotection grâce à l'utilisation de bloquants des récepteurs ionotropiques au glutamate (Choi et al., 1987 ; Lai et al., 2014). Malheureusement, la compréhension de ces mécanismes cellulaires n'a pas permis jusqu'à ce jour, de mettre en place une thérapeutique efficace en clinique.

9. Limites des modèles

Jusqu'à maintenant, la recherche translationnelle a échoué à mettre en place une thérapie efficace contre les AVC, ceci malgré une multitude de pistes prometteuses obtenues grâce à la

recherche fondamentale et aux différents modèles décrits ci-dessus. Plusieurs facteurs pourraient expliquer les multiples échecs observés en clinique (Tableau 2).

Tableau 2 : Explications potentielles de l'échec des traitements lors des essais cliniques.
(Adapté de Sutherland et al., 2012)

OBSERVATION SUR LE MODÈLE ANIMAL	OBSERVATION CHEZ L'HOMME
Population fortement homogène et très contrôlée	Population fortement hétérogène et très variable
Expériences réalisées chez les animaux jeunes	Majoritairement chez des patients âgés
Expériences réalisées chez des mâles	Patients femmes et hommes
Pas (ou peu) de facteur de co-morbidité	Nombreux facteur de co-morbidités
L'AVC est induit	L'AVC est spontané
Etiologie uniforme	Etiologie variable
Le territoire ischémié est souvent dans la zone de l'artère cérébrale moyenne	Le territoire ischémié n'est pas restreint à la zone de l'artère cérébrale moyenne
Contrôle temporel de la fenêtre thérapeutique	Faible contrôle de la fenêtre thérapeutique
Traitement administré précocement	Traitement administré avec un délai variable
Contrôle précis de la durée de l'occlusion	Durée variable de l'occlusion
Echantillon de population de taille adéquate	Echantillon de taille insuffisante
Large optimisation des doses des traitements pharmacologiques	Peu d'optimisation de dose des traitements pharmacologiques
Voies d'administration multiples	Voie d'administration limitée
Traitement rapidement disponible dans la zone ciblée	Traitement lentement disponible dans la zone ciblée
L'étude de la taille de la lésion est utilisée pour évaluer le traitement	L'étude des fonctions cognitives sont utilisées pour évaluer le traitement

Tout d'abord, les expériences sont réalisées sur des animaux dont la provenance et le fond génétique sont très contrôlés afin de limiter les variabilités, mais les cohortes de patients sont, à l'inverse, très hétérogènes. De plus, la majorité des expériences sont réalisées sur des animaux mâles, jeunes et ne présentant pas de co-morbidités, alors que les patients atteints

d'AVC sont majoritairement âgés, de sexe masculin ou féminin et présentant le plus souvent des pathologies associées. Notons également que dans les différents modèles animaux d'ischémie, l'attaque est induite par l'expérimentateur avec une durée d'occlusion finement contrôlé avec en général une thérapeutique précoce, alors que chez le patient on assiste à des ischémies spontanées de durée variable, et surtout le plus souvent avec une administration de traitement retardée dû au temps de prise en charge. Enfin, dans beaucoup d'études, l'effet d'un traitement est évalué par une quantification de la taille de la lésion ischémique, et beaucoup plus rarement par un test comportemental permettant d'évaluer la récupération fonctionnelle. En clinique, même si l'imagerie permet également de localiser les lésions et de suivre leurs évolutions, l'évaluation du traitement se fait majoritairement en terme de récupération fonctionnelle pour le patient traité (Fisher et al., 2009 ; Braeuninger et al., 2009 ; Sutherland et al., 2012 ; Mergenthaler et Meisel, 2012).

Aux vues de ces nombreux échecs pour trouver des thérapeutiques permettant de lutter efficacement contre les AVC, les chercheurs ont dû se tourner vers de nouvelles cibles. En effet, durant de nombreuses années, les recherches se sont principalement focalisées sur les neurones tout en ignorant les cellules gliales avoisinantes. Ces études ont montré que les neurones présentaient une plus grande vulnérabilité vis-à-vis de l'ischémie que les cellules gliales, notamment les astrocytes qui semblaient conserver de l'ATP plus longtemps que les neurones et posséder moins de récepteurs ionotropiques à leur membrane (Rossi 2015 ; voir chapitre II-9 de l'introduction). Cela a conduit ainsi à une approche thérapeutique orientée sur la neuroprotection, qui n'a obtenu que très peu de résultats en clinique. Ces dernières années, une vision plus globale a émergé, en s'intéressant à l'unité neurovasculaire. Dans ce scénario l'astrocyte joue un rôle important, d'une part parce qu'il contacte des centaines (voir des milliers pour certains) de synapses en provenance des neurones, et d'autre part via ces contacts avec d'autres cellules gliales (syncytium astrocytaire) et l'étroite interaction avec les péricytes et les cellules endothéliales du système vasculaire. De ce point de vue, l'astrocyte est un élément central faisant le lien entre les différents partenaires du réseau cérébral et devient donc une piste thérapeutique intéressante. Si les rôles physiologiques des astrocytes sont décrits et admis, leurs rôles dans l'ischémie restent moins bien caractérisés.

II. Les astrocytes

1. Introduction

Le terme astrocyte a été introduit pour la première fois en 1893 par Michael von Lenhossek en référence à la forme étoilée de ces cellules gliales (Kettenmann et Ranson, 2005). Pourtant ces cellules avaient déjà été observées, notamment par Camillo Golgi dans les années 1870. Historiquement les astrocytes sont décrits, notamment par Santiago Ramon y Cajal, comme supports métaboliques pour les neurones. En effet, les observations de Golgi ont déjà montré une étroite interaction entre les vaisseaux sanguins et les astrocytes, pouvant faire le lien entre les vaisseaux sanguins et les neurones. Cependant, les astrocytes ont durant de longues années été négligés. Depuis maintenant une trentaine d'années, la communauté scientifique travaillant sur les astrocytes n'a cessé d'augmenter, et il est maintenant acquis que les astrocytes sont impliqués dans de nombreux mécanismes cérébraux (Figure 10).

Les astrocytes ont donc été considérés comme pouvant être sensibles à l'activité neuronale avoisinante par le biais d'un large répertoire de récepteurs et de transporteurs fixant les neurotransmetteurs, et pouvant même réguler cette activité en modulant la quantité de neurotransmetteurs externes. Ceci a donné naissance au concept de la synapse tripartite (voir chapitre II-7 de l'introduction). De nos jours, les travaux sur les astrocytes représentent un pan de recherches en neurosciences à part entière. D'un point de vue physiologique, il a été montré que les astrocytes pouvaient réguler en partie le flux cérébral et la barrière hémato-encéphalique (Quaeghebeur et al., 2011). Mais ils peuvent également réguler la concentration extracellulaire de potassium, de neurotransmetteurs, ainsi que l'homéostasie hydrique (Simard et al., 2004). D'autre part, dans certaines conditions, les astrocytes semblent également pouvoir moduler l'activité synaptique (Araque et al., 2014). Il semble donc raisonnable de voir les astrocytes comme des « intermédiaires anatomiques et fonctionnels » qui contrôlent l'activité cérébrale locale (Attwell et al., 2010). Il ne faut pas oublier le rôle important de ces cellules lors du développement cérébral, notamment dans la migration neuronale (Sloan et al., 2014). Ces ensembles de fonctions diverses et variées peuvent sans doute s'expliquer par une forte hétérogénéité des astrocytes.

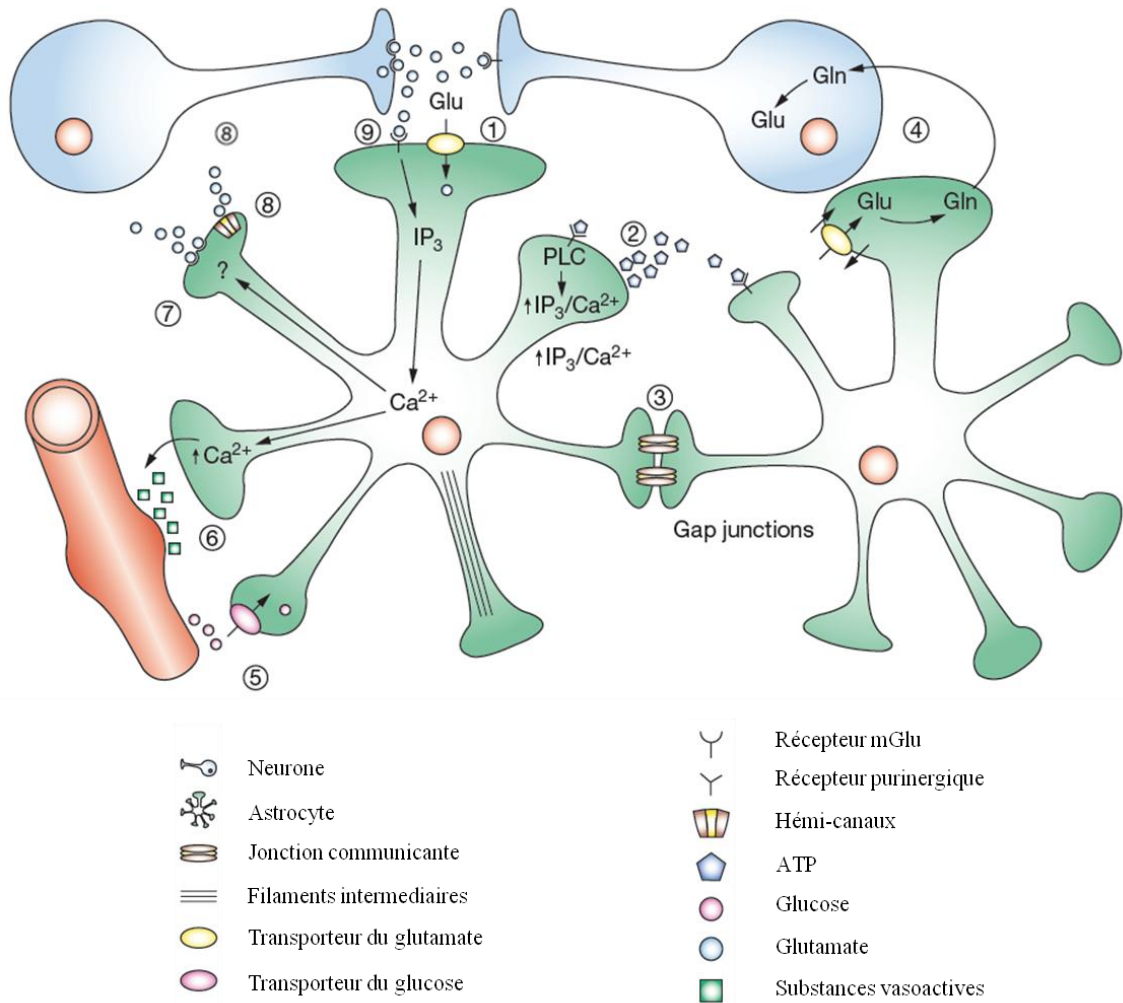


Figure 10 : Intégrations des principales fonctions astrocytaires (d'après Maragakis et Rothstein, 2006)

1. Recapture du glutamate libéré à la fente synaptique
2. Communication entre astrocytes possible par relargage d'ATP dans l'espace extracellulaire
3. Organisation des astrocytes en syncytium grâce à la présence de jonctions communicantes
4. Recyclage du glutamate en glutamine pour permettre aux neurones de synthétiser de nouveau du glutamate
5. Capture du glucose par les pieds astrocytaires à partir des vaisseaux sanguins
6. Modulation du débit sanguin par libération de substances vasoactives
7. Libération de gliotransmetteurs vésiculaires, tels que le glutamate
8. Libération de gliotransmetteurs via les hémicanaux
9. Le glutamate libéré par les neurones se fixant sur les récepteur mGlu astrocytaires entraîne une montée de calcium dans les astrocytes

2. Hétérogénéité astrocytaire

Tout comme les neurones, les astrocytes présentent une forte hétérogénéité. En effet, si au sein de cette grande classe de cellules que sont les neurones on distingue des neurones excitateurs et des neurones inhibiteurs (suivant la nature des neurotransmetteurs libérés, ou encore des différences d'expression de récepteurs membranaires), cette complexité est également retrouvée au sein des astrocytes, terme générique pour une population de cellules gliales aux caractéristiques diverses et variées, présentant une hétérogénéité morphologique (Figure 11), développementale, moléculaire et fonctionnelle (Zhang et al., 2010). Initialement, une classification basée sur la morphologie a permis de regrouper les astrocytes en trois groupes principaux : les astrocytes protoplasmiques, fibreux et radiaires. Les astrocytes protoplasmiques sont retrouvés majoritairement dans la substance grise. Ils possèdent de longs prolongements fins dans toutes les directions de l'espace, leur conférant un aspect étoilé. Les astrocytes fibreux, localisés dans la substance blanche au contact des nœuds de Ranvier, possèdent des prolongements avec de nombreux embranchements entourant les synapses et quelques prolongements directement en contact avec les vaisseaux sanguins (Schitine et al., 2015). Enfin, les astrocytes radiaires regroupant à l'âge adulte les cellules de Müller de la rétine et les cellules de Bergmann du cervelet, possédant de longs prolongements tous orientés dans une direction unique, contactant également les vaisseaux sanguins et formant la 'glia limitans'. Cependant, cette classification semble maintenant dépassée grâce à l'amélioration des techniques d'imagerie qui ont pu donner une idée plus détaillée de la morphologie des astrocytes, ainsi que des analyses biochimiques plus précises (Schitine et al., 2015). Il est donc également possible de classer en partie les astrocytes en fonction de l'expression génique de marqueurs spécifiques de ces cellules, comme par exemple la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), la GS (Glutamine transferase), les transporteurs gliaux du glutamate (GLAST/EAAT1, GLT-1/EAAT2), S100 β (une protéine de liaison du calcium) ou encore ALDH1L1 (protéine enzymatique au rôle d'Aldéhyde déhydrogénase) (Emsley et al., 2006). Cependant, il existe une grande diversité d'expression de ces marqueurs d'une région cérébrale à une autre. En effet, la GFAP a pendant longtemps, été utilisée comme le marqueur astrocytaire par excellence, mais elle présente en réalité deux désavantages importants. D'une part, son expression varie en fonction de l'état de l'astrocyte, notamment en condition physiologique versus pathologique, et d'autre part il semblerait que de nombreux astrocytes n'expriment pas la GFAP en assez grande quantité pour être détectée par immunohistochimie (Khakh et al., 2015). Une étude plus poussée de la diversité d'expression des différents marqueurs astrocytaires pourrait aider à comprendre la diversité et le rôle des astrocytes dans différentes pathologies (Schitine et al., 2015).



Figure 11 : Illustration de la diversité astrocytaire

Dès le 19^{ème} siècle, la diversité des cellules astrocytaires avait été mise en évidence dans le cortex humain. Marquage de cellules gliales par la coloration de Golgi sur coupe verticale du gyrus du lobe frontal (d'après Matyash et al., 2010)

3. Organisation cytoarchitectonique

Les astrocytes sont présents dans toutes les structures du cerveau, et même si la proportion de 90% des cellules du cerveau humain semble maintenant largement surévaluée, il n'en demeure pas moins qu'il s'agit d'une population quantitativement très importante de cellules (Herculano-Houzel, 2014). Les astrocytes sont en étroite interaction avec les neurones. Leurs prolongements vont recouvrir les synapses et ainsi participer à l'homéostasie ionique et à la recapture des neurotransmetteurs. Chaque astrocyte va couvrir une région qui lui est propre (Figure 12), et contactera de très nombreuses synapses. Par exemple, dans la région CA1 de l'hippocampe, un seul astrocyte peut contacter jusqu'à 100000 synapses (Bushong et al., 2002). Pour autant, l'activité d'un même neurone pourra également être modulée par différents astrocytes (Halassa et al., 2007). Même si les astrocytes vont recouvrir un domaine qui leur est propre, il existe de fortes interactions entre les astrocytes qui forment un syncytium astrocytaire, ce dernier étant fondamental pour la communication entre astrocytes. En effet, les astrocytes vont être reliés aux astrocytes voisins via des jonctions communicantes directes (Gap junction, Figure 13), permettant l'échange de molécules de petite taille (jusqu'à 1.2kDa), laissant ainsi passer des ions, mais également des molécules métaboliques de faible poids moléculaire tel que l'ATP, l'IP3, l'AMPc, le GMPc ou encore le glucose (Giaume et al., 2010). En effet, si les astrocytes ne sont pas capables de générer des potentiels d'action comme les neurones, ils pourront quand même communiquer les uns avec les autres via ces jonctions communicantes, et principalement par des échanges de calcium, on parlera le plus souvent de vague calcique pour illustrer cette communication astrocytaire (Giaume et al., 2010).

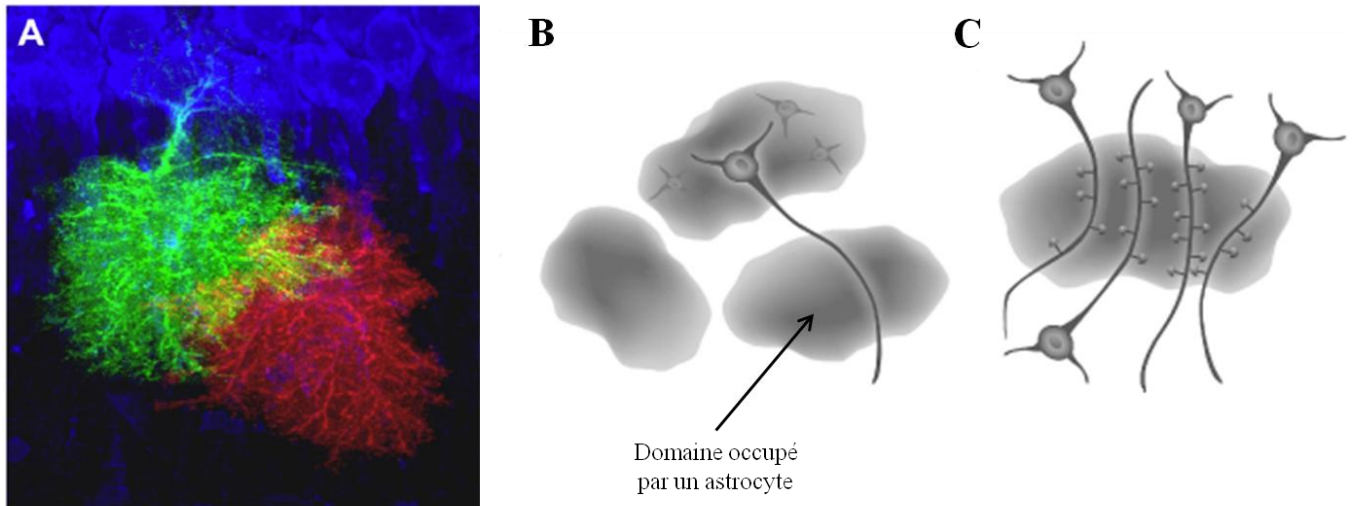


Figure 12 : Territoire astrocytaire

- A. Visualisation dans l'hippocampe de deux astrocytes voisins marqués par colorant fluorescent (Alexa 488, en vert et alexa 568 en rouge) recouvrant chacun un territoire qui lui est propre. La partie centrale en jaune représente la zone de contact entre les deux astrocytes avec très peu de superposition (d'après Agulhon et al., 2008)
- B. Représentation schématique des domaines astrocytaires : Un même neurone peut contacter plusieurs astrocytes
- C. Un même astrocyte sera en étroite interaction avec plusieurs dendrites de différents neurones (d'après Halassa et al., 2007)

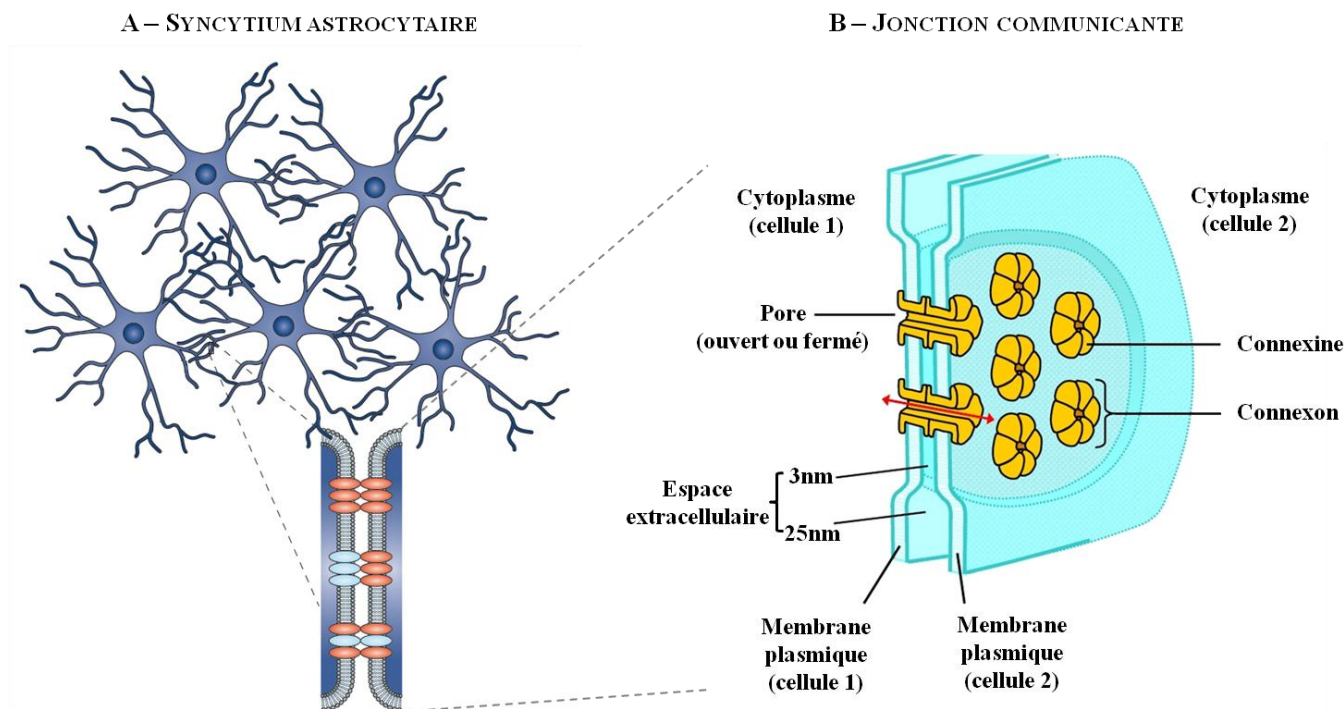


Figure 13 : Organisation du syncytium astrocytaire et représentation des jonctions communicantes

- A. Les astrocytes sont en interaction les uns avec les autres au sein du réseau astrocytaire: on parle de syncytium. La communication entre astrocytes se fait par des jonctions communicantes (D'après Giaume et al., 2010).
- B. Un connexon est composé de l'assemblage de 6 molécules de connexine, et la jonction communicante résulte du rapprochement de 2 connexons situés sur la membrane plasmique de deux cellules avoisinantes. Le pore formé par la jonction communicante pourra être à l'état ouvert ou fermé. Une fois ouvert, le pore laissera passer des ions, des petites molécules tels que l'ATP ou encore le glucose (Connors et al., 2004).

4. Calcium astrocytaire

Le calcium est le messager fondamental de la communication astrocytaire. De nombreuses études, à la fois sur culture d'astrocytes, sur tranche de cerveau et, depuis quelques années *in vivo*, ont montré des changements de la concentration de calcium intracellulaire spontanée dans les astrocytes, en réponse à l'activation du réseau neuronal après changements induits par la libération de neurotransmetteurs. La montée calcique dans les astrocytes peut provenir de la libération du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique, ou bien de l'entrée du calcium extracellulaire. Si la plupart des astrocytes n'expriment pas de canaux calciques sensibles au potentiel, ils expriment en revanche un large répertoire de pompes, transporteurs, échangeurs, récepteurs ionotropiques et métabotropiques membranaires (Figure 14). Parmi eux, on retrouve une forte expression dans les astrocytes de récepteurs ionotropiques permettant l'entrée de Ca^{2+} dans le cytoplasme des cellules. On retrouve des récepteurs ionotropiques au glutamate (NMDA, AMPA, Kainate), mais également des récepteurs ionotropiques à l'ATP (P2X). C'est le cas par exemple des cellules de Bergmann du cervelet

qui expriment des récepteurs AMPA, qui une fois activés par le glutamate font rentrer du Ca^{2+} dans l'astrocyte (Piet et Jahr, 2007), et qui possèdent également des récepteurs P2X7 fonctionnels (Habbas et al., 2011). De plus, on retrouve également des SOCC (Stored Operated Calcium Channel) qui vont permettre de faire rentrer du Ca^{2+} venant de l'extérieur. Il a notamment été montré une forte expression de SOCC sur les cellules de Bergmann du cervelet (Singaravelu et al., 2006). Le calcium entré dans les astrocytes par ces différentes « protéines canaux », va ensuite être finement régulé et stocké dans le réticulum endoplasmique. En effet, la concentration de calcium libre dans le cytosol des astrocytes est estimée à environ 100nM (Reyes et Parpura, 2009), tandis que la concentration de Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique est de l'ordre de 100 à 300 μM (Nedergaard et al., 2010). Il existe donc des mécanismes actifs permettant de faire entrer le calcium dans le réticulum endoplasmique contre son gradient de concentration. Le calcium du réticulum endoplasmique permettra de répondre à divers signaux reçus par les astrocytes.

Ainsi, les astrocytes expriment également un large répertoire de récepteurs métabotropiques membranaires tels que les récepteurs mGluR au glutamate ou les récepteurs P2Y à l'ATP, qui sont couplés à des protéines G entraînant l'activation de voies de signalisations intracellulaires qui *in fine* interagissent avec le calcium. Ainsi par exemple, l'activation de la phospholipase C conduit à une augmentation cytosolique d'IP3 (Figure 14). Cet IP3 peut se fixer sur les récepteurs à l'IP3 présents sur le réticulum endoplasmique permettant la libération de Ca^{2+} des stocks intracellulaires. Il faudra alors de nouveau faire rentrer du Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique pour reconstituer les stocks et y maintenir une concentration élevée de calcium. L'activation des SOCC, relativement abondants dans tous les types de cellules gliales permet de maintenir une concentration de calcium élevée dans le réticulum endoplasmique. Ces différentes montées de calcium dans le cytoplasme des astrocytes représentent des informations sur l'état d'activité du réseau neuronal, qui peuvent être transmises vers le syncytium astrocytaire par transfert de calcium d'un astrocyte à un autre : on parlera de vagues calciques. Même si tous les mécanismes induits par les montées calciques astrocytaires ne sont pas encore complètement connus, il n'en demeure pas moins que le calcium est un messenger fondamental pour le fonctionnement des astrocytes. La montée de calcium dans les astrocytes peut également entraîner la libération de molécules neuroactives considérées comme étant des gliotransmetteurs (voir chapitre II-6 de l'introduction).

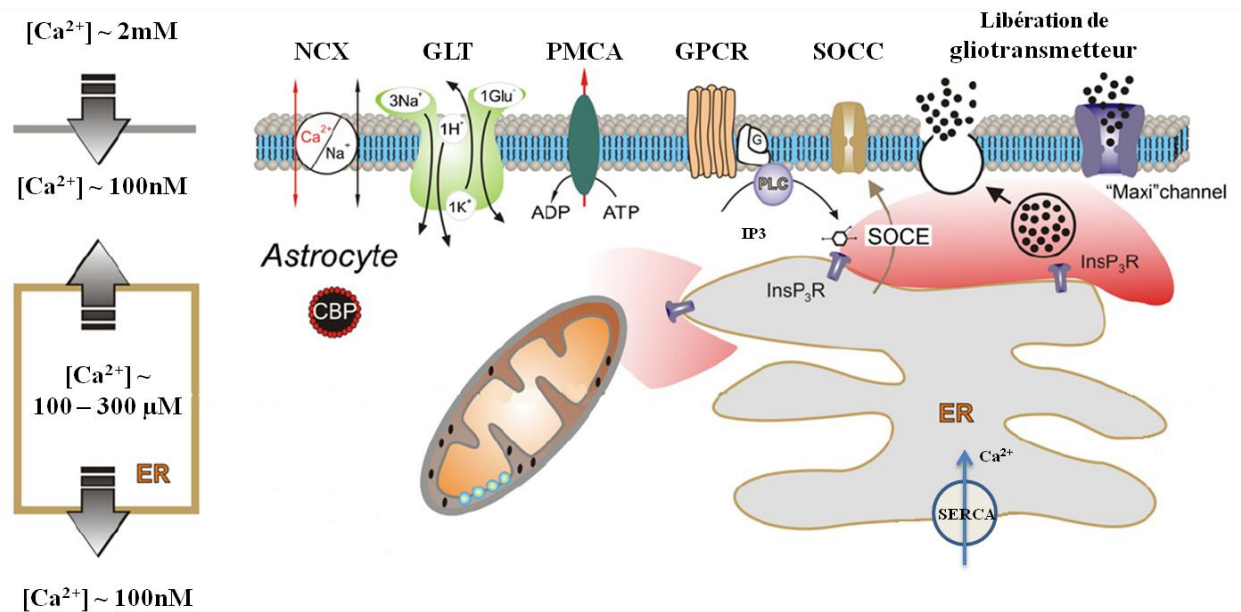


Figure 14 : Cascade de signalisation calcique dans les astrocytes

La concentration de calcium intracellulaire est finement régulée par l'activation de protéines nécessitant de l'énergie pour fonctionner contre le gradient transmembranaire de concentration du calcium. On retrouve exprimé à la membrane plasmique des astrocytes des transporteurs Na⁺/Ca²⁺ (NCX), des transporteurs du glutamate (GLT), des pompes PMCA (Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase), des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G (GPCR), des canaux SOCC (Store Operated Ca²⁺ Channel), ainsi que d'autres canaux regroupés sous le terme « maxi channel » tels que les récepteur P2X₇ ou les pannexines. Au niveau du réticulum endoplasmique, on retrouve une forte expression de récepteur à l'IP₃, ainsi que des pompes SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase) permettant de stocker le calcium libre dans le réticulum endoplasmique. On retrouve également de nombreuses protéines cytoplasmiques fixant le calcium (Calcium Binding Protein, CBP, ex:S100B) (d'après Nedergaard et al., 2010)

5. Fonctions astrocytaire de base

a. Support métabolique

Le maintien constant des différents gradients ioniques, ainsi que leur restauration après chaque potentiel d'action, mais également la recapture et le recyclage des neurotransmetteurs vont contribuer à la très forte demande énergétique du cerveau, et notamment des neurones. Il semblerait que l'excitabilité neuronale, avec la décharge de potentiels d'action représente le coût énergétique le plus important pour le fonctionnement cérébral (Alle et al., 2009). Cette énergie nécessaire est fournie via le plasma circulant dans les vaisseaux sanguins, sous forme de glucose. Même si les neurones peuvent directement obtenir du glucose provenant du

système vasculaire, il a été montré que les astrocytes captent plus de la moitié des besoins énergétiques nécessaires, alors que leur consommation propre n'excéderait pas 15% (Chuquet et al., 2010 ; Bélanger et al., 2011). Cette donnée renforce l'idée que les astrocytes jouent un rôle fondamental de support métabolique pour les neurones. En effet, les pieds astrocytaires sont au contact direct des vaisseaux sanguins (Figure 15), ce qui leur permet de capter le glucose sanguin, via des transporteurs au glucose (GLUT), et d'en stocker une faible quantité sous forme de glycogène. Par la suite, le glucose et le glycogène peuvent être métabolisés rapidement en lactate en fonction des besoins énergétiques neuronaux et deviennent ainsi une source importante d'énergie pour les neurones (Rouach et al., 2008). Une étude réalisée *in vivo* confirme la forte consommation de lactate par le cerveau, et montre même une préférence pour l'utilisation du lactate par rapport au glucose quand les deux substrats énergétiques sont disponibles (Wyss et al., 2011 ; Jolivet et al., 2015). En revanche, les neurones ne feront pas de stock de glycogène (Maggistretti et Allaman, 2015). Cependant, ce modèle selon lequel l'astrocyte tient une place centrale dans l'apport de substrat énergétique aux neurones, via l'apport de lactate, a été nuancé par des travaux récents. En effet, des travaux montrent que les neurones pourraient capter directement le glucose dans le milieu extracellulaire, et générer de l'ATP à la fois par glycolyse et par métabolisme oxydatif (Lundgaard et al., 2015), sans nécessairement utiliser de lactate provenant des astrocytes (Patel et al., 2014). Des études d'imagerie par microscopie à deux photons réalisées *in vivo* chez la souris utilisent un analogue du glucose pour visualiser la capture de substrat énergétique, et montrent, à la fois au repos mais également au cours d'une forte activité que, les neurones sont les principaux consommateurs de glucose (Lunggaard et al., 2015). Par conséquent, l'hypothèse selon laquelle, l'augmentation de glutamate libéré par les neurones à la suite d'une forte activité cérébrale serait perçue par les astrocytes comme un signal de besoin énergétique pour les neurones, et entraînerait ainsi l'apport de lactate par les astrocytes (Vlaskovits et al., 2006), pourrait être remise en question. Quoi qu'il en soit, l'augmentation de l'activité cérébrale nécessite un apport énergétique plus important, et les astrocytes participant à la régulation du flux sanguin, permettent ainsi de réguler l'apport de glucose au cerveau.

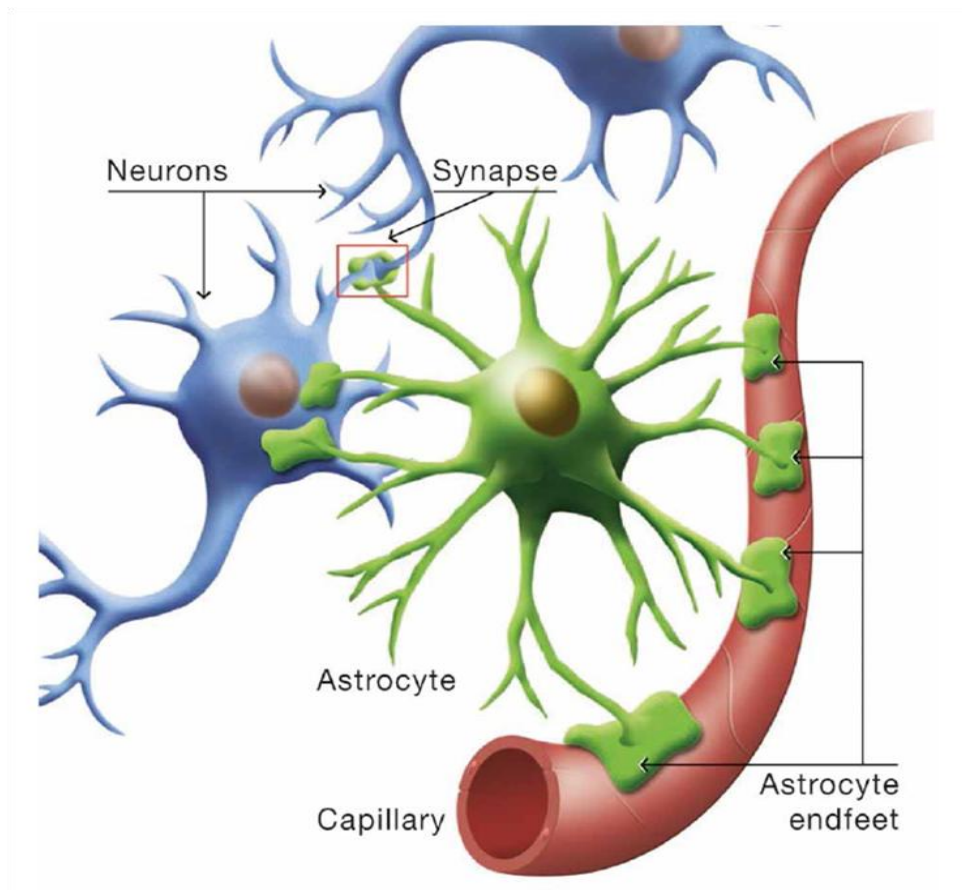


Figure 15 : Représentation de l'astrocyte au sein du réseau cérébral

Les pieds astrocytaires permettent un contact direct avec les capillaires sanguins (d'après Demetrius et al., 2015).

b. Régulation du flux sanguin par les astrocytes

Certaines études d'imagerie ont permis de mettre en évidence la régulation du débit sanguin dans le cerveau. En effet, la tomographie par émission de positon (TEP) permet d'étudier des variations de débit sanguin cérébral qui est une mesure indirecte de l'activité du cerveau. Par conséquent, l'augmentation du débit sanguin est une réponse à l'augmentation de l'activité cérébrale nécessitant des besoins énergétiques plus importants. Les astrocytes, de part leur positionnement idéal à l'interface des neurones et des vaisseaux sanguin, vont être des acteurs importants de la modulation du flux cérébral. Ceci est réalisé par la libération de substances vaso-actives au niveau des pieds astrocytaires, permettant la vasodilatation ou la vasoconstriction des vaisseaux en fonction des besoins énergétiques (Petzold et al., 2011). La recapture du K^+ par les astrocytes (voir chapitre II-5-c de l'introduction) ne module pas le diamètre des vaisseaux sanguins (Attwell et al. 2010). En effet, des expériences ont montré que la dépolarisation directe des astrocytes du fait de l'entrée de charges positives (K^+), n'entraînait pas de changement de diamètre des vaisseaux sanguins voisins (Metea et al., 2007). En revanche, parmi les substances vasoactives libérées par les astrocytes, on retrouve :

- ✓ L'acide arachidonique (AA) qui a une action vasoconstrictrice (Attwell et al., 2010).
- ✓ La prostaglandine E2 (PGE2) ou les acides epoxyeicosatrienoïcs (EETs) provoquant une vasoconstriction locale.
- ✓ L'acide 20-hydroxyeicosatetraenoïc (20-HETE) permettant d'augmenter l'apport énergétique par une action vasodilatatrice locale (Attwell et al., 2010 ; MacVicar et al., 2015).

Deux revues récentes confirment l'implication des astrocytes dans la régulation du flux sanguin permettant de contrôler le diamètre des vaisseaux sanguins, et ainsi de maîtriser le débit sanguin et les apports énergétiques (Filosa et al., 2015 ; MacVicar et al., 2015).

c. Homéostasie potassique

Les cellules gliales jouent un rôle important pour maintenir l'homéostasie ionique ainsi que la balance hydrique du milieu externe. Elles expriment de nombreux récepteurs, canaux, transporteurs et pompes qui composent un ensemble dynamique capable de réagir à toute modification ionique induite par l'activité neuronale (Walz, 2000 ; Simard et al., 2004).

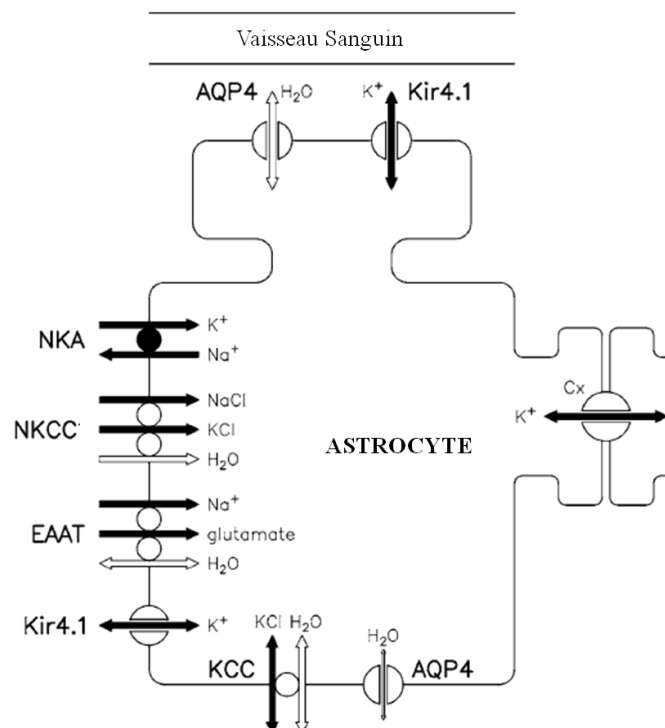


Figure 16 : Transport astrocytaire du K^+

Représentation schématique des protéines membranaires astrocytaires impliquées dans le transport du K^+ et de l'eau dans le système nerveux (d'après MacAulay et Zeuthen, 2012). NKA : Na^+/K^+ -ATPase ; EAAT : transporteur du glutamate ; Kir4.1 : canaux K^+ à rectification entrante ; KCC : transporteur K^+/Cl^- ; AQP4 : canaux à l'eau ; Cx : connexines.

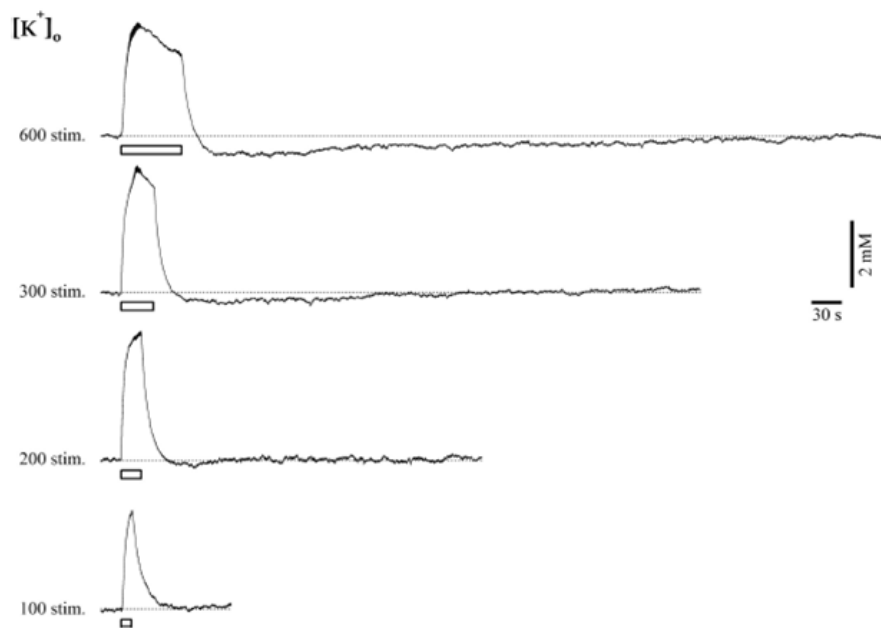


Figure 17 : Exemple d'augmentation de K^+ extracellulaire suite à une stimulation électrique

Enregistrements de l'augmentation de la $[K^+]_o$ extracellulaire réalisés *in vivo* avec une électrode sensible au potassium, à la suite de différents trains de stimulations électriques des fibres de l'hippocampe (d'après Chever et al., 2010).

Les astrocytes, grâce à leur position en interaction avec les neurones et les vaisseaux sanguins, ainsi qu'à leur organisation en syncytium, jouent un rôle important de contrôle du milieu extracellulaire. Ils présentent de nombreux mécanismes pour réguler les variations de K^+ extracellulaire : la recapture passive via les canaux K^+ , les transporteurs $Na^+/K^+/Cl^-$ et le transport actif par la Na^+/K^+ ATPase (Figure 16). La redistribution du K^+ de l'espace extracellulaire vers les régions périvasculaires, est due principalement aux canaux K^+ à rectification entrante, Kir (Canaux K^+ inward rectifier, Sontheimer, 1992). Les canaux de type Kir4.1 sont fortement exprimés dans les astrocytes et ceci à la membrane qui entoure les synapses, ainsi que dans les pieds astrocytaires qui contactent les vaisseaux sanguins (Poopalasundaram et al., 2000 ; Higashi et al., 2001). Les canaux Kir4.1, comme les Kir en général, ont une forte probabilité d'ouverture pour des potentiels membranaires proches du potentiel de repos des astrocytes. Leur conductance augmente lorsque le potentiel de membrane s'hyperpolarise, tandis qu'elle diminue fortement pour des potentiels dépolarisants. De plus, leur conductance augmente avec la concentration de K^+ extracellulaire (voir Hille, « ion channels of excitable membrane », 1991). De nombreuses études électrophysiologiques, menées chez des souris sauvages et déficientes pour le gène codant le canal Kir4.1, montrent que ce type de canal K^+ est impliqué dans le maintien du potentiel membranaire astrocytaire à des valeurs hyperpolarisées proche du potentiel d'équilibre du K^+ (Djukic et al., 2007 ; Olsen et al., 2008). Lors d'une activité neuronale intense il y a une augmentation locale de la

concentration de K^+ extracellulaire suite à l'activation des canaux K^+ de la rectification retardée sensibles au potentiel des neurones (Figure 17). Cette augmentation modifie alors le potentiel d'équilibre du K^+ vers des valeurs moins négatives, induisant une dépolarisation locale des neurones et des astrocytes. Cependant, ces derniers étant connectés via les jonctions communicantes en réseau, ceci permet de garder le potentiel membranaire des cellules gliales à une valeur négative. Par ce mécanisme, il a été proposé que les astrocytes retirent du milieu extracellulaire le K^+ en excès pour le redistribuer dans les astrocytes voisins à travers le syncytium, voire vers des régions à concentration de K^+ plus basse. On parle de « siphonage » du K^+ extracellulaire, qui a été d'abord mis en évidence dans la glie radiaire de Müller de la rétine, et ensuite retrouvé dans d'autres structures telles que le cortex et l'hippocampe (Amzica et al., 2002).

Un autre mécanisme impliqué dans la recapture du K^+ externe est la pompe Na^+/K^+ . Cette enzyme utilise l'énergie d'hydrolyse de l'ATP pour transporter 2 ions K^+ et 3 ions Na^+ contre leurs gradients de concentration. Ce transport actif est électrogène car à chaque cycle, son activité génère un courant électrique sortant. Il semblerait que les astrocytes et les neurones expriment des isoformes différentes de cette ATP-ase, lui conférant des différences fonctionnelles. Les astrocytes exprimeraient des Na^+/K^+ -ATPases à faible affinité pour le K^+ extracellulaire par rapport aux ATPases Na^+/K^+ neuronales (Hajek et al., 1996). Cette propriété implique que les astrocytes sont plus efficaces à répondre à de fortes augmentations de K^+ externe, que les neurones. De plus, le transport du K^+ dans les astrocytes peut également faire intervenir le cotransporteur $Na^+/K^+/Cl^-$ (NKCC). Ce cotransporteur, utilise le gradient électrochimique du Na^+ et du Cl^- pour faire entrer du K^+ . La stochiométrie est telle que, pour chaque ion K^+ qui entre dans la cellule, un ion Na^+ et 2 ions Cl^- rentrent en même temps, rendant ce cotransporteur électriquement neutre (Simard et al., 2004 ; Kimelberg et al., 2005). Par ailleurs, des études ont montré que la capacité des neurones à recapter le K^+ externe en excès est faible, rendant ainsi le « siphonage » du K^+ par les astrocytes crucial, ceci pour le bon fonctionnement du réseau neuronal. De plus, les changements osmotiques induits par l'ensemble de ces transports d'ions entraînent des mouvements d'eau dans les tissus (Figure 16). Les astrocytes sont également très impliqués dans les régulations de flux d'eau dans le réseau cérébral.

d. Homéostasie hydrique

La fine régulation de la concentration de K^+ extracellulaire entraîne également une fine régulation du volume extracellulaire. En effet, l'entrée de K^+ dans les astrocytes augmente l'osmolarité intracellulaire, qui est donc suivie d'une entrée d'eau par gradient osmotique. Cette eau peut directement passer par les canaux Kir4.1 et certains transporteurs décrits dans le paragraphe précédent, selon les lois de la diffusion et de l'équilibre de Gibbs-Donnan (Leis et al., 2005). De plus, les astrocytes expriment des canaux perméables à l'eau, les aquaporines, principalement de type 4 (AQP4) (Amiry-Moghaddam et al., 2003). Tout comme le potassium, l'eau va également se répartir dans le réseau astrocytaire, mais

également pouvoir être libérée dans la circulation sanguine, ce qui est favorisé par la forte expression d'AQP4 au niveau des pieds astrocytaires entourant les vaisseaux sanguins (Benfenati et al., 2010) (Figure 16). A travers les aquaporines, l'entrée d'eau se fait rapidement et semble faciliter les influx ioniques (Song et al., 2012). En effet, des études réalisées dans l'hippocampe *in vitro* et *in vivo* montrent, grâce à l'enregistrement des concentrations de K^+ extracellulaires par microélectrodes, que la recapture du K^+ est fortement ralentie chez les souris AQP4^{-/-} (Binder et al., 2006 ; Strohschein et al., 2011). Les régulations de l'homéostasie potassique et hydrique sont donc deux mécanismes qui fonctionnent en parallèle et qui sont complémentaires l'un de l'autre. Finalement, l'augmentation de K^+ extracellulaire générée par l'activité neuronale aura pour conséquence une diminution locale de l'espace extracellulaire associée à un gonflement des astrocytes entourant les synapses, ceci suite de l'entrée de potassium et d'eau dans les astrocytes (Figure 18). Cette fonction astrocytaire physiologique peut être dérégulée dans des conditions pathologiques telles que l'ischémie (voir chapitre I-6-d de l'introduction).

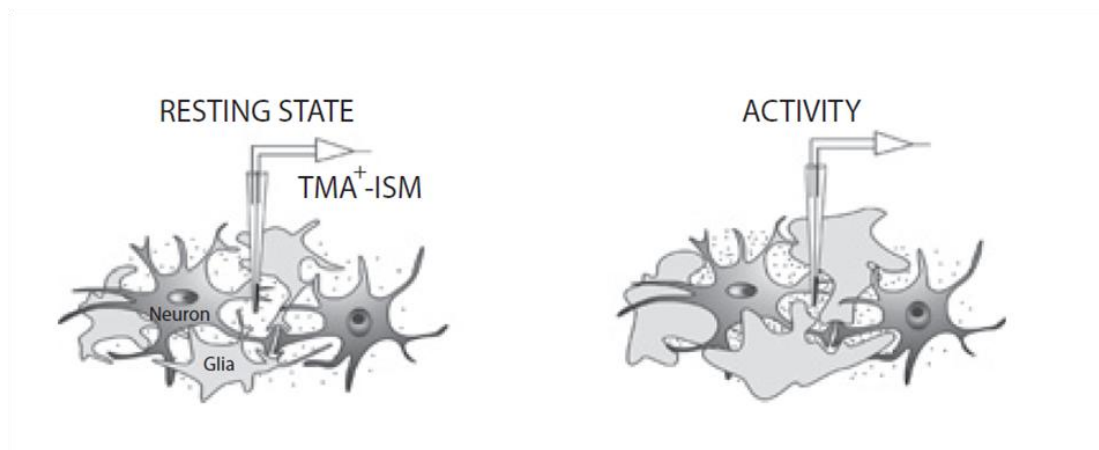


Figure 18 : Illustration du changement de volume astrocytaire au cours de l'activité neuronale

Le gonflement des astrocytes à la suite de l'activité neuronale entraîne une réduction de l'espace extracellulaire. Cette diminution de l'espace extracellulaire peut être déterminée en mesurant la concentration extracellulaire d'un ion imperméant tel que le TMA. Il s'agit d'une des techniques les plus fine pour mesurer le phénomène du swelling (Pannasch et al., 2011)

e. Recapture des neurotransmetteurs à la synapse

La libération de neurotransmetteurs par les neurones est la clé de la transmission de l'information neuronale. La présence de neurotransmetteurs dans le milieu extracellulaire, au niveau de la fente synaptique, se doit d'être finement régulée pour le bon fonctionnement du réseau neuronal. Les astrocytes ont été décrits comme étant capables de capter certains neurotransmetteurs afin de réguler leur clairance. En effet, pour concevoir une neurotransmission efficace, avec une résolution spatiale et temporelle très forte, il faut mettre

en place un système de recapture évitant une sur-activation du réseau dans le temps qui pourrait conduire au phénomène d'excitotoxicité, ainsi qu'à une diffusion des neurotransmetteurs entraînant une perte de sélectivité de l'information. On retrouve donc largement exprimés, de nombreux transporteurs pour le glutamate, le GABA ou encore la glycine. Les transporteurs peuvent être retrouvés à la fois sur les neurones mais aussi sur les astrocytes, montrant une collaboration entre les deux types cellulaires pour contrôler la concentration extracellulaire du neurotransmetteur (Eulenburg et al., 2010). Les astrocytes expriment une haute densité de transporteurs du glutamate de type GLAST et GLT-1. Les transporteurs du glutamate sont électrogènes et fonctionnent à l'aide du gradient électrochimique du Na^+ et du K^+ . En effet l'entrée d'une molécule de glutamate est couplée à l'entrée de 3 ions Na^+ et d'1 ion H^+ , ainsi qu'à la sortie d'un ion K^+ (Verkhratsky et Butt, 2007). Une fois dans l'astrocyte, le glutamate est converti par la glutamine synthétase en glutamine, un métabolite inactif. La glutamine est ensuite libérée dans le milieu extracellulaire par les astrocytes et captée par les neurones, où elle peut de nouveau être convertie en glutamate (Figure 19).

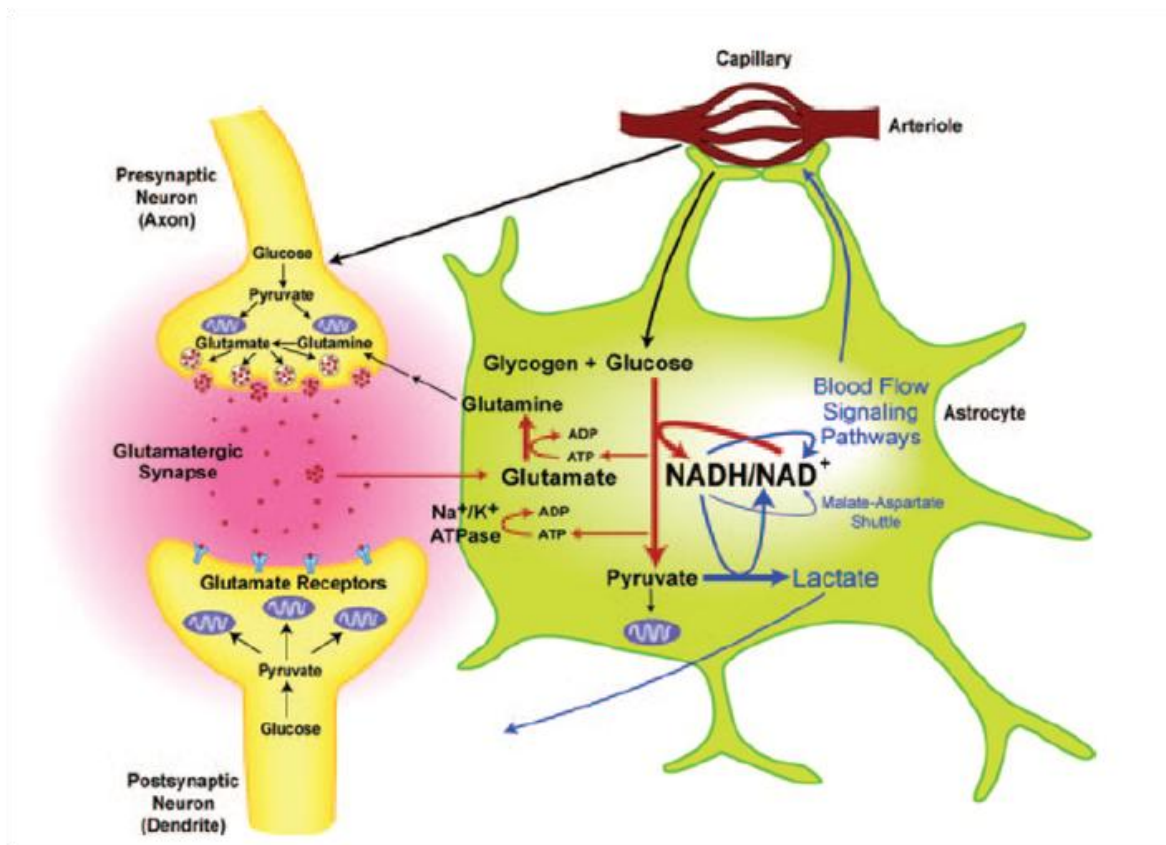


Figure 19 : Modèle de recapture et de recyclage du glutamate par les astrocytes

Le glutamate libéré dans la fente synaptique va être en partie capté par les astrocytes et converti en glutamine. La glutamine, libérée par les astrocytes, servira aux neurones pour former du glutamate. Cette recapture du glutamate permettrait d'informer les astrocytes sur les besoins énergétiques du réseau, et ainsi faire le lien avec le système vasculaire. (D'après Vlassenko et al., 2006)

La recapture du glutamate est coûteuse d'un point de vue énergétique et entraîne une augmentation du métabolisme astrocytaire, mais elle demeure un processus fondamental pour le fonctionnement du système nerveux car elle permettrait également aux astrocytes d'évaluer les besoins énergétiques neuronaux. Néanmoins, cette théorie à récemment été remise en discussion par des travaux *in vivo* récents montrant une certaine indépendance des neurones vis-à-vis de l'apport énergétique par les astrocytes (Lundgaard et al., 2015 ; voir chapitre II-5-a de l'introduction). Dans certaines conditions pathologiques extrêmes, telle que l'ischémie, les systèmes de recapture peuvent se retrouver dépassés, cela pouvant aller jusqu'à une inversion des transporteurs conduisant à la libération de glutamate par les astrocytes (Voir chapitre II-9 de l'introduction). Cependant, dans des conditions physiologiques, les astrocytes ont été décrits comme capables de libérer également des molécules neuroactives : les gliotransmetteurs.

6. Gliotransmetteurs

Une des conséquences de l'augmentation du calcium intracellulaire dans les astrocytes est la libération de molécules neuroactives, qui vont pouvoir moduler l'activité synaptique, les cellules gliales voisines, ou les cellules vasculaires. Ces molécules neuroactives ont été qualifiées de gliotransmetteurs, parmi lesquels on retrouve le glutamate, la D-serine, l'ATP ou encore le GABA (Volterra et al., 2014) mais également divers peptides, chimiokines et cytokines (Halassa et al., 2010). Ainsi, la D-serine astrocytaire peut favoriser l'activation des récepteurs NMDA (Figure 20) en se fixant sur le site glycine (Mothet et al., 2000), ou en contribuant à la mise en place de la 'potentialisation à long-terme' (LTP) dans l'hippocampe (Yang et al., 2003). Les exemples sont donc maintenant nombreux pour illustrer ce dialogue bidirectionnel entre les astrocytes et les neurones. Le mode de libération des gliotransmetteurs ne semble, pour autant, pas être totalement établi. La libération pourrait se faire par voie non-vésiculaire via des protéines membranaires, ou par l'exocytose de vésicules nécessitant une montée de calcium intracellulaire ressemblant à la libération de neurotransmetteurs par les neurones. Cependant l'exocytose de gliotransmetteurs par les astrocytes reste un sujet très controversé malgré la présence de vésicules ainsi que l'expression de certaines protéines d'exocytose (Bezzi et al., 2004 ; Jourdain et al., 2007). En effet, à ce jour, seule l'équipe de Volterra a pu mettre en évidence ce phénomène. Par ailleurs, plusieurs études ont montré, à la fois sur culture d'astrocytes, sur tranche de cerveau et même *in vivo*, une libération du glutamate par les astrocytes suite à une augmentation de la concentration de calcium interne (Takana et al., 2011 ; Navarrete et al., 2012 ; Martineau, 2013). En effet, dans l'étude de Navarrete, les auteurs montrent que le glutamate est libéré par les astrocytes suite à une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire, ceci à l'aide de souris déficientes pour le récepteur IP3R2, l'isoforme des récepteurs IP3 détecté dans la glie. Cette libération de gliotransmetteur est dépendante de l'activation de récepteurs couplés à la protéine Gq et également dépendante d'une augmentation de calcium intracellulaire. La libération de glutamate Ca^{2+} -dépendante semble donc ici moduler la plasticité neuronale en modifiant la LTP des synapses glutamatergiques CA3-CA1 de l'hippocampe (Navarrete et al., 2012).

Il existe d'autres mécanismes, non vésiculaires, pour expliquer la libération de gliotransmetteur, notamment l'activation de récepteurs purinergiques P2X7. L'activation de ces récepteurs par l'ATP extracellulaire conduit à la formation d'un pore non sélectif par lequel les astrocytes pourraient libérer du glutamate, de l'ATP ou de la D-sérine. Cependant, ce mécanisme a été initialement identifié et démontré dans des cellules du système immunitaire et des cultures d'astrocytes (Ballerini et al., 1996), et dans un travail effectué dans l'hippocampe *in situ* (Fellin et al., 2006), mais n'a pas encore été reproduit dans d'autres études *in situ*. Les gliotransmetteurs peuvent également être libérés grâce à l'ouverture d'hémicanaux présents à la membrane, tels que les pannexines (Thompson et Macvicar, 2008), par l'inversion des transporteurs (voir chapitre II-6 de l'introduction), ou par des canaux anioniques (VRAC : Volume regulated anion channels) activés par des déformations de la membrane plasmique (Ye et al., 2009 ; Hamilton et Atwell, 2010).

La capacité des astrocytes à influencer l'activité neuronale par la libération de glutamate suite à une augmentation de Ca^{2+} cytosolique est cependant remise en cause par certains auteurs. La conception de souris transgéniques qui permettent d'activer ou bloquer les transitoires calciques dépendant de Gq dans les astrocytes a permis d'étudier dans le détail cette problématique. Il est en effet possible de conclure qu'une montée de calcium, importante dans les astrocytes, n'est pas suffisante pour affecter l'excitabilité neuronale (Fiacco et al., 2007 ; Agulhon et al., 2008) ni pour moduler la LTP dans l'hippocampe (Agulhon et al., 2010).

Finalement il est intéressant de noter que les montées de calcium intracellulaire dans les astrocytes de l'hippocampe et du cervelet peuvent moduler le potentiel membranaire des neurones par une régulation de la concentration de potassium extracellulaire (Wang et al., 2012a ; Wang et al., 2012b). En effet, l'augmentation du calcium cytosolique dans les astrocytes après activation de la voie de signalisation dépendant de Gq, se traduirait par une augmentation de l'activité de la pompe Na^+/K^+ -ATPase conduisant à une recapture plus importante du K^+ extracellulaire (Wang et al., 2012a). Ainsi, indépendamment de toute libération de gliotransmetteur, la concentration de K^+ extracellulaire serait diminuée, entraînant une légère hyperpolarisation des neurones, les rendant moins excitables (Wang et al., 2012).

Cependant, ces conclusions s'appuient sur des études étudiant une région précise du cerveau et ne peuvent pas être généralisés à l'ensemble des études faites sur le domaine de la gliotransmission qui demeure actuellement un sujet très débattu. Afin d'apporter des arguments plus précis dans ce débat, il serait notamment intéressant de développer de nouvelles techniques d'imagerie calcique, qui pourrait peut être mettre en évidence de nouvelles sources de montées calciques n'impliquant pas l'IP3R2 dans les astrocytes (Davila et al., 2013).

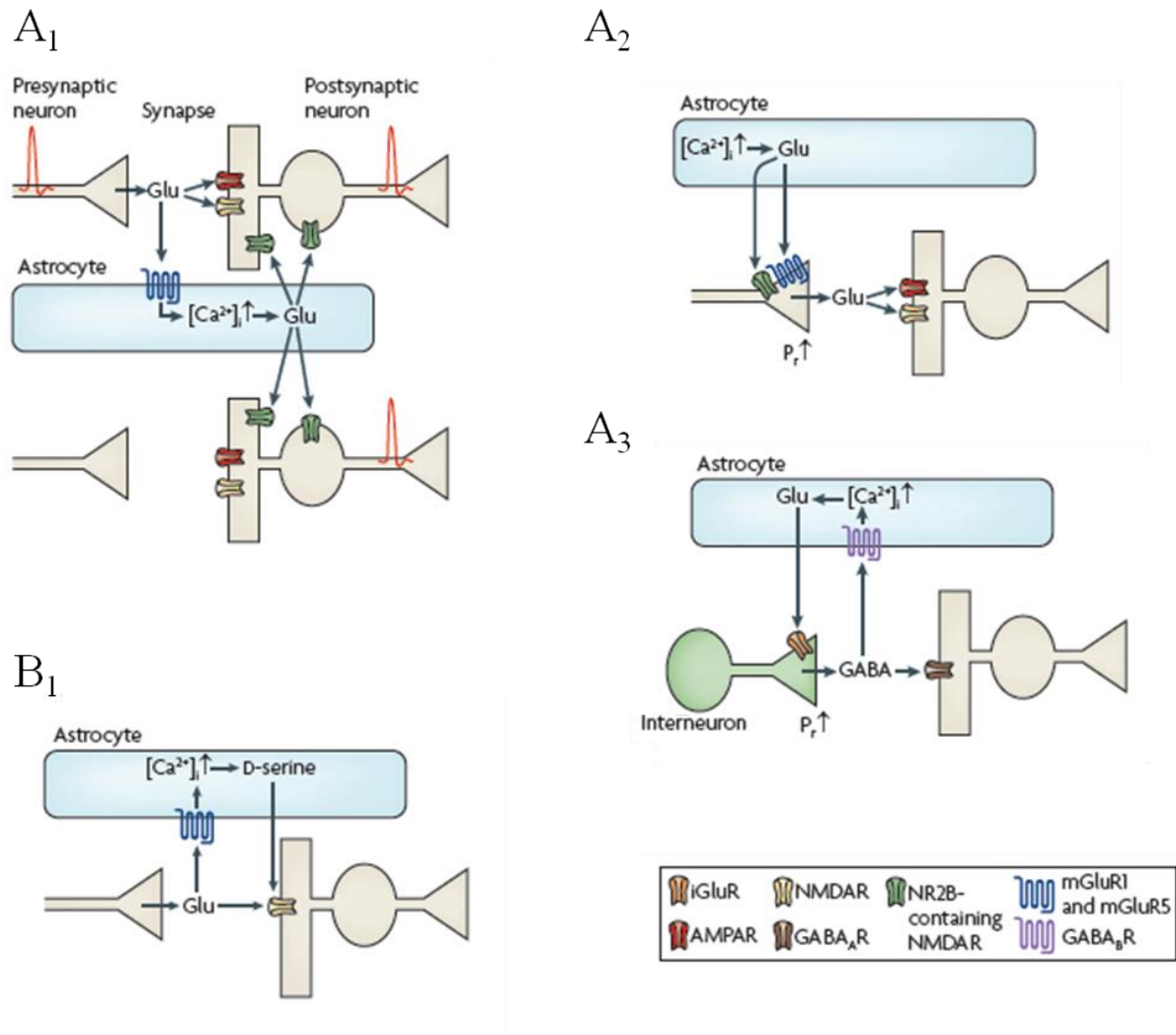


Figure 20 : Illustration de certains effets des gliotransmetteurs libérés par les astrocytes

- A. Effet du glutamate relargué par les astrocytes. (A₁) Le glutamate libéré module l'excitabilité neuronale et la synchronisation du réseau en activant des récepteurs extrasynaptiques sur les neurones postsynaptiques. (A₂) Le glutamate astrocytaire active des récepteurs présynaptiques qui augmentent la quantité du glutamate neuronal libéré, potentialisant l'activité excitatrice de la synapse. (A₃) Phénomène également observé sur des neurones GABAergiques, permettant aux astrocytes de potentialiser la réponse inhibitrice.
- B. La libération de D-serine par les astrocytes permet de moduler l'activité des récepteurs NMDA postsynaptiques, et ainsi de moduler la plasticité synaptique. (d'après Hamilton et Attwell, 2010)

7. Synapse tripartite

Le concept de synapse tripartite a maintenant une quinzaine d'années et a permis d'avoir une nouvelle vision de la communication neuronale et de sa modulation (Araque et al., 1999). D'après ce concept, la synapse est composée de trois unités : le bouton pré-synaptique, l'élément post-synaptique et les prolongements astrocytaires entourant les deux parties neuronales (Figure 21). On assiste donc à une communication entre astrocytes et neurones lors de la transmission de l'information à la synapse. La communication bidirectionnelle entre astrocyte et neurone par libération de gliotransmetteurs reste ici un modèle et n'est pas accepté par l'ensemble de la communauté scientifique (voir chapitre II-6 de l'introduction).

De façon intéressante, « l'enrobage » des synapses est un mécanisme dynamique qui peut être modifié au cours du temps. En effet, les synapses tripartites semblent être principalement localisées dans les zones actives du cerveau (Hirrlinger et al., 2004). Le recouvrement des synapses par les astrocytes peut donc évoluer en fonction de l'activité électrique du cerveau. Les prolongements astrocytaires, visualisés après transfection virale de molécules fluorescentes, peuvent en effet se rétracter d'une synapse à l'échelle temporelle de l'ordre de la minute comme cela a été observé sur des cultures organotypiques d'hippocampe de souris (Haber et al., 2006). Ce phénomène de rétraction astrocytaire est impliqué aussi dans le processus de lactation, au niveau de l'hypothalamus. La rétraction astrocytaire via une modulation de la neurotransmission glutamatergique dans cette structure centrale, va permettre d'augmenter la production d'ocytocine qui *in fine* va déclencher la production de lait (Figure 22, Oliet et al., 2006). Des modifications astrocytaires peuvent également être observées à l'échelle de la composition des protéines membranaires. Il a en effet récemment été montré dans l'hippocampe une diffusion des transporteurs du glutamate (GLT-1) au sein de la membrane des astrocytes, permettant de réguler la quantité de glutamate à la fente synaptique, et donc de moduler la transmission excitatrice de cette synapse (Murphy-Royal et al., 2015). Cette mobilité des transporteur GLT1 semble être dépendante de l'activité neuronale car elle est en partie bloquée par l'inhibition des conductances sodiques voltage-dépendantes lors de l'utilisation de TTX (Murphy-Royal et al., 2015).

Un autre acteur dans la mise en place de la synapse tripartite semble être les jonctions communicantes présentes sur les astrocytes, et principalement la sous unité connexine 43 (Cx43). En effet, l'utilisation de souris déficientes en Cx43 a permis de montrer que la présence de Cx43 sur les astrocytes pouvait moduler l'activité synaptique glutamatergique au niveau des cellules pyramidales CA1 de l'hippocampe en augmentant la libération de glutamate (Chever et al., 2014). Ces résultats illustrent une interaction importante entre neurone et astrocyte, comme le montrent de plus en plus de publications ces dernières années.

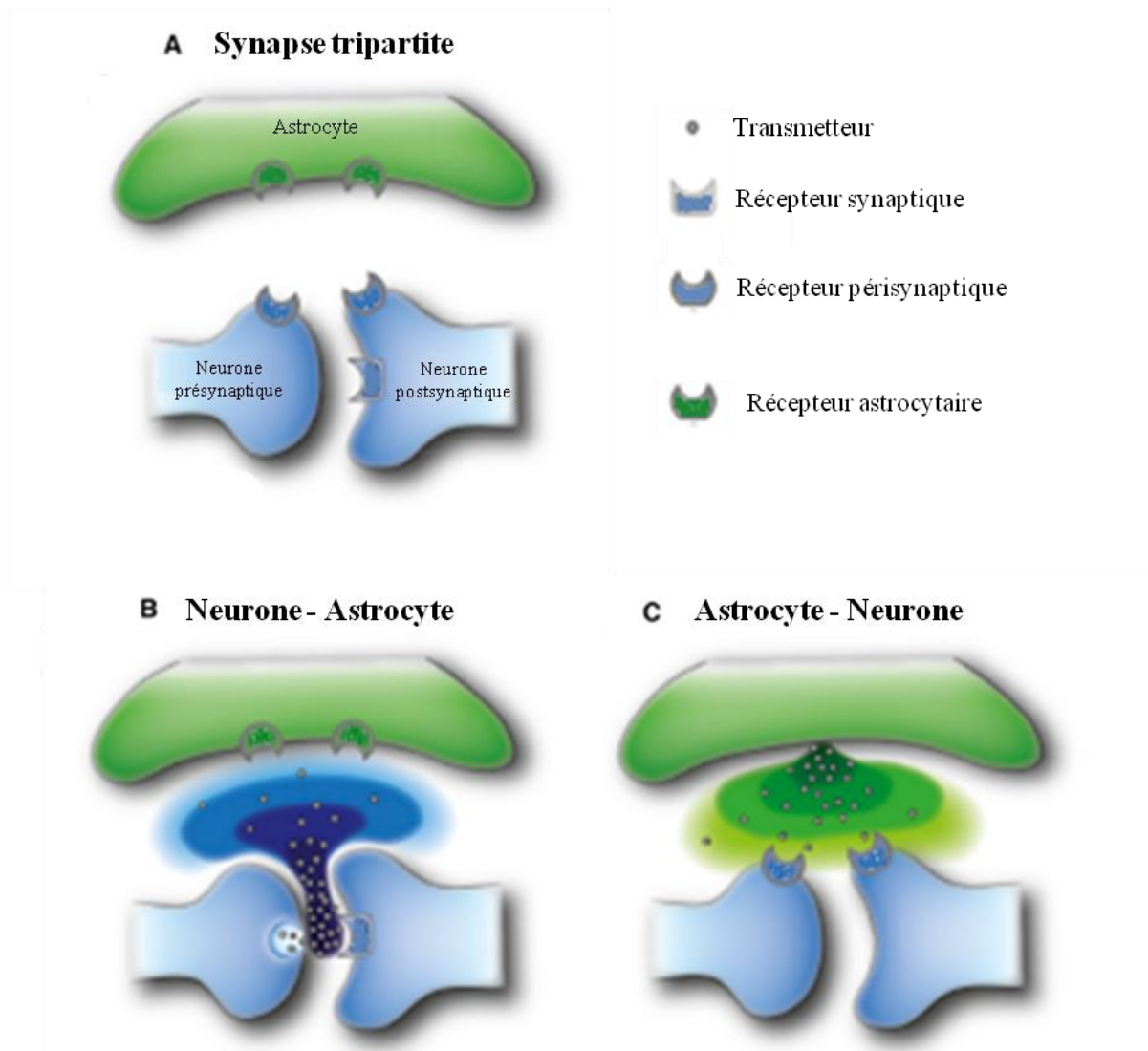


Figure 21 : Communication bidirectionnelle entre astrocyte et neurones

- A. Représentation schématique de la synapse tripartite, comprenant le neurone présynaptique, le neurone postsynaptique, et le prolongement astrocytaire qui entoure la synapse
- B. Les neurotransmetteurs libérés par l'activation du neurone pré-synaptique vont rapidement activer les récepteurs présents sur le neurone post-synaptiques, mais par diffusion, pourront également activer les récepteurs astrocytaires
- C. Les gliotransmetteurs libérés par les astrocytes pourront activer les récepteurs périssynaptiques des neurones pré et post-synaptiques, modulant ainsi l'activité neuronale (d'après Araque et al., 2014)

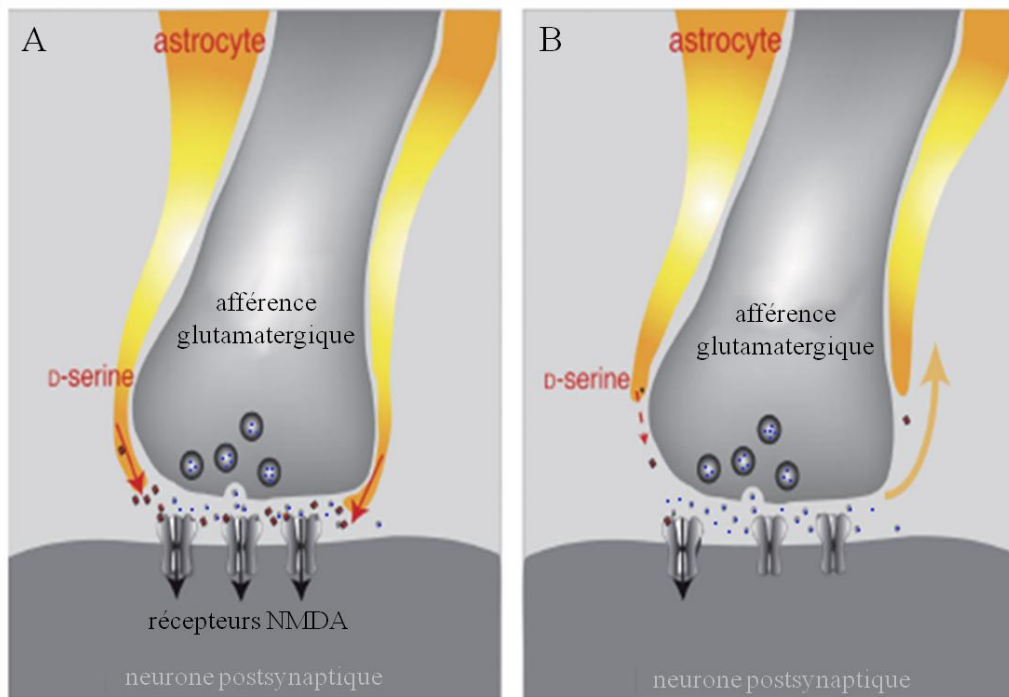


Figure 22 : Rétractation astrocytaire impliqué dans la plasticité synaptique au niveau du noyau supra optique de l'hypothalamus (SON)

- A. Chez une rate vierge, les prolongements astrocytaire recouvrent la synapse glutamatergique (libération vésiculaire de glutamate, points bleus), y libérant de la D-serine (points rouges), potentialisant ainsi l'activation des récepteurs NMDA de l'élément postsynaptique.
- B. Chez la femelle gestante, en lactation, les prolongements astrocytaires se rétractent, entraînant une diminution importante de l'apport de D-serine au niveau de la fente synaptique, diminuant de ce fait l'activation des récepteurs NMDA. La plasticité synaptique est donc fortement modulée par les astrocytes et la libération de gliotransmetteur (d'après Théodanis et al., 2008).

8. Astrocytes en conditions pathologiques

Les nombreuses avancées des connaissances sur les rôles des astrocytes dans la physiologie du système nerveux central ont conduit les recherches à s'intéresser à l'impact de ces cellules dans diverses conditions pathologiques. En effet, il existe maintenant de nombreuses preuves montrant l'implication des astrocytes dans des pathologies telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie d'Alexander, ou encore l'ischémie (Ben Haim et al., 2015 ; Schitine et al., 2015 ; Rossi et al., 2015). Nous allons par la suite développer uniquement l'impact de l'ischémie sur les astrocytes, mais en gardant à l'esprit que les astrocytes sont impliqués dans de nombreuses autres pathologies neurodégénératives.

9. Réponses astrocytaires à l'ischémie

D'un point de vue cellulaire, les astrocytes, comme les neurones, montrent des conséquences délétères suite à l'ischémie (voir paragraphe I-6 de l'introduction). Cependant, il existe de fortes différences entre les astrocytes et les neurones, et il semblerait que les astrocytes soient plus résistants que les neurones à ce phénomène. La rapidité des effets induits par l'ischémie dépend de la disponibilité des réserves énergétiques pour les cellules, ainsi que de leur consommation d'énergie sous forme d'ATP (Figure 23). Les neurones ont une consommation énergétique plus importante que les astrocytes, et par conséquent, à la suite d'une ischémie, la diminution de l'ATP intracellulaire est plus rapide pour les neurones, leur permettant de maintenir les gradients de concentrations ioniques moins longtemps (Silver et al., 1997 ; Xie et al., 2008). De plus, même si les quantités restent limitées, les astrocytes disposent de plus de réserves sous forme de glycogène que les neurones (Brown, 2004). En condition physiologique, les astrocytes peuvent fournir de l'énergie aux neurones sous forme de lactate (voir chapitre II-5-a de l'introduction), laissant imaginer un rôle protecteur des astrocytes en conditions ischémiques comme pourvoyeur métabolique pour les neurones, leur permettant ainsi de retarder la dysrégulation ionique. Cependant, la forte production de lactate conduisant à une acidification importante du milieu intracellulaire, contrebalancerait l'effet bénéfique du lactate comme substrat métabolique (Rossi et al., 2007).

De nombreuses études ont montré une libération importante de glutamate au cours de l'ischémie (chapitre I-6-b de l'introduction). Par conséquent, tant que les astrocytes sont capables de maintenir leur gradient ionique, ils peuvent participer à la recapture du glutamate. En revanche, une fois leur réserve d'énergie épuisée, ils ne sont plus en mesure de limiter la concentration de glutamate dans le milieu extracellulaire. De plus, la dysrégulation ionique conduit à une inversion des transporteurs du glutamate, entraînant un relargage de glutamate par les astrocytes (Rossi et al., 2000). En plus de l'inversion des transporteurs du glutamate, les astrocytes peuvent également libérer du glutamate via des canaux anioniques de type VRAC (Kimelberg et al., 2005), ou encore à la suite d'une acidification du pH intracellulaire (Beppu et al., 2014). Cette libération de glutamate au cours de l'ischémie par les astrocytes contribue à amplifier le phénomène d'excitotoxicité.

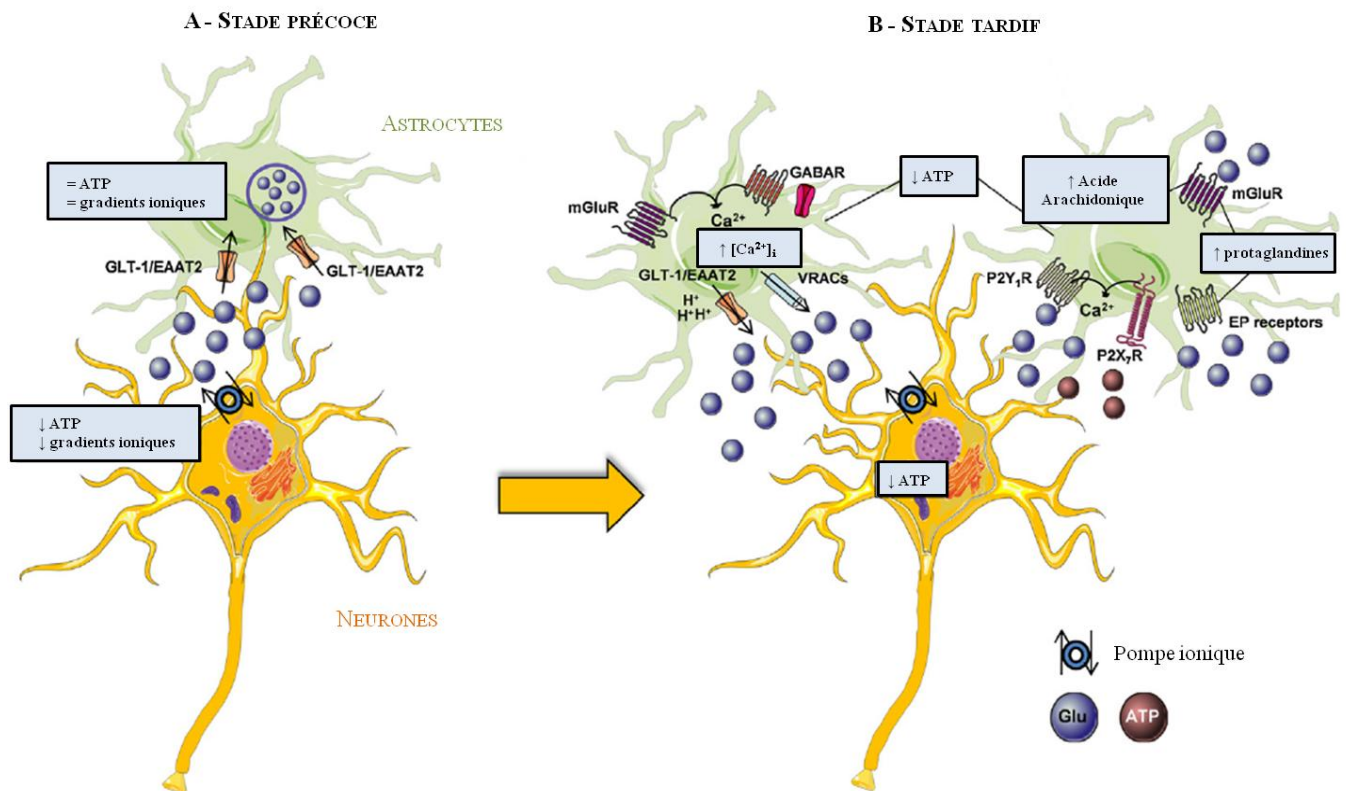


Figure 23 : Représentation schématique des facteurs astrocytaires impliqués dans la réponse à l'ischémie au niveau de la zone de pénombre

- Au stade précoce, les astrocytes semblent plus résistants que les neurones, grâce au maintien de l'ATP intracellulaire. Cela leur permet de garder leurs gradients ioniques, et de recapter le glutamate (conférant aux astrocytes des propriétés protectrices contre l'excitotoxicité).
- Au cours d'une ischémie prolongée, lorsque l'ATP intracellulaire des astrocytes a également diminué, entraînant la perte des gradients ioniques, les astrocytes participent à la libération de glutamate dans le milieu extracellulaire. Ce glutamate peut être libéré par inversion du transporteur, mais également via l'ouverture des canaux VRACs. La production d'acide arachidonique et de prostaglandine semble pouvoir augmenter la libération de glutamate par les astrocytes et avoir des conséquences délétères sur le tissu nerveux (d'après Rossi et al., 2015).

De plus, au cours de l'ischémie, des montées calciques très importantes sont présentes, pouvant se propager par vagues calciques au sein du réseau astrocytaire. Ces montées calciques pourraient être la cause de la propagation des dommages dans la zone de pénombre, en raison, éventuellement, de la libération de gliotransmetteurs (Nedergaard et al., 2005 ; Giaume et al., 2007 ; Nedergaard et al., 2010).

Dans des conditions physiologiques, les astrocytes exercent des fonctions indispensables au bon fonctionnement du réseau cérébral. En revanche, dans des conditions pathologiques telles que l'ischémie, il semblerait que la dérégulation de certaines fonctions astrocytaires entraîne une aggravation des « dégâts » dus à l'ischémie. Cependant, il reste à ce jour difficile de savoir si les astrocytes jouent un rôle globalement protecteur ou délétère, pour les neurones.

En effet, parmi les fonctions déjà décrites exercées par les astrocytes (voir chapitre II-5 de l'introduction), certaines sont protectrices pour le réseau. Dans un premier temps l'homéostasie ionique, hydrique et glutamatergique va limiter les effets de l'ischémie. Les astrocytes sont également décrits comme des cellules capables de libérer de nombreuses molécules pouvant agir sur le réseau cérébral (Clarke et Barres, 2013). En effet, parmi ces molécules, les astrocytes vont libérer des antioxydants ainsi que des facteurs neurotrophiques tels que le BDNF (Bergami et al., 2008). De plus, les astrocytes peuvent servir de guide pour la réparation axonale.

A l'inverse, certains phénomènes ont été décrits comme étant délétères pour le réseau neuronal. Parmi ceux-ci, le gonflement astrocytaire et les phénomènes d'œdème pourraient conduire à une perturbation locale du flux sanguin. En effet, un gonflement des pieds astrocytaires entourant un vaisseau sanguin pourrait conduire à l'obturer en partie. Mais ils peuvent également induire des dommages neuronaux secondaires, comme la libération de glutamate. De plus, à plus long terme, la cicatrice astrocytaire empêche la repousse axonale, même si dans un premier temps elle a participé à limiter l'expansion des dégâts liés à l'ischémie (Nedergaard et al., 2005). Néanmoins, les aspects protecteurs et délétères dépendent surtout du « timing » et de l'intensité du phénomène ischémique initial. Le fonctionnement du syncytium astrocytaire illustre bien cette notion. En effet, le syncytium astrocytaire va permettre de diffuser les substances toxiques aux cellules avoisinantes, permettant de les répartir, réduisant *de facto* la toxicité et limitant la mortalité des cellules, conférant ainsi un rôle protecteur à l'organisation en syncytium. En revanche, ce fonctionnement devient délétère si la concentration de substances toxiques devient trop importante. En effet, dans ce cas, au lieu de protéger les cellules, il y aura propagation de la mort cellulaire au sein du réseau (Rossi et al., 2007 ; figure 24).

Finalement, ces différentes observations laissent penser que préserver les propriétés physiologiques des astrocytes pourrait contribuer de façon importante à la survie neuronale dans la zone de pénombre (Giaume et al., 2007 ; Nedergaard et al., 2010).

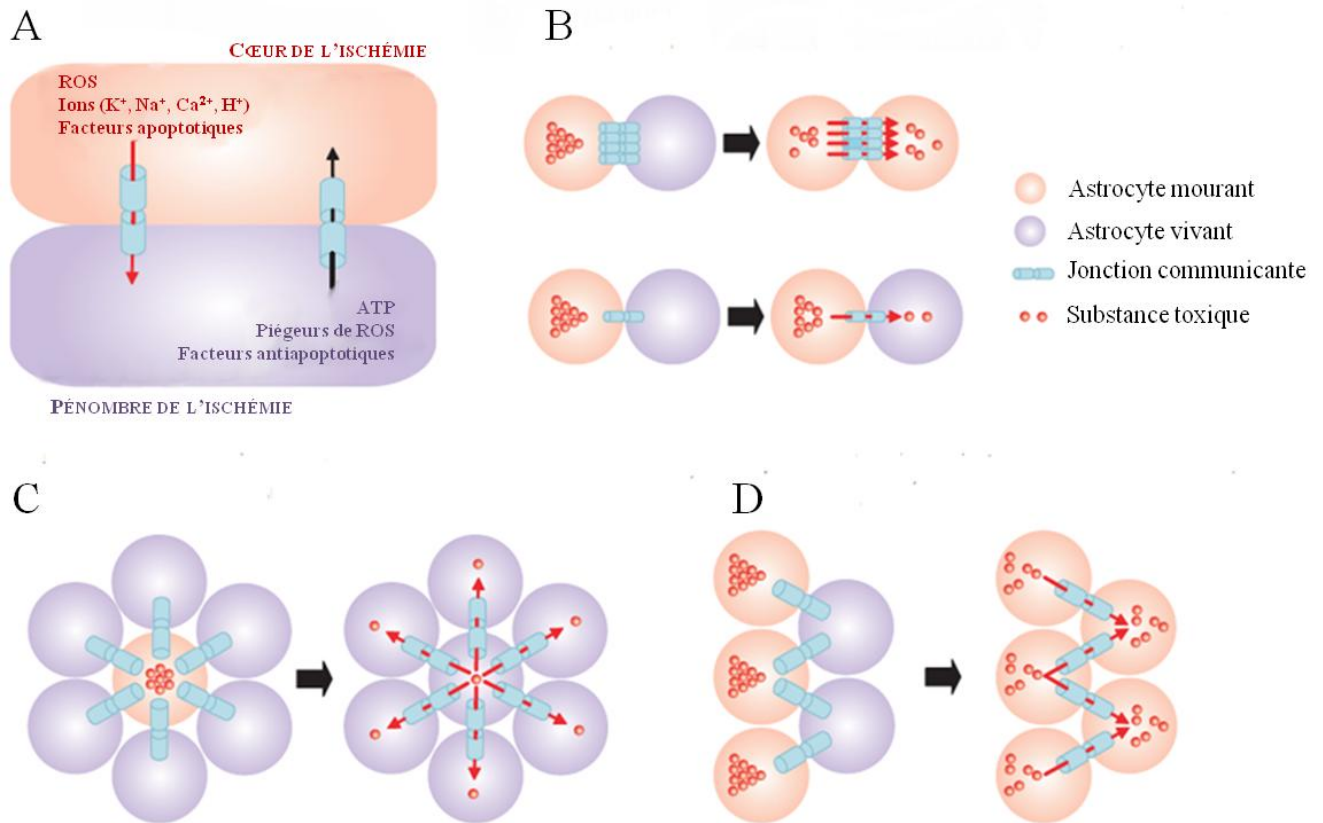


Figure 24 : Illustration schématique des interactions possibles entre les astrocytes au cours de l'ischémie

- Les substances toxiques émises par des cellules lésées dans le cœur de l'ischémie diffusent vers les cellules saines via les jonctions communicantes, et à l'inverse des substances protectrices diffusent des cellules saines de la zone de pénombre vers les cellules en souffrance dans le cœur de l'ischémie.
- Le nombre de jonctions communicantes va déterminer la quantité de passage de molécules dans les cellules avoisinantes.
- Représentation schématique d'un cas où la diffusion au sein du syncytium sera protectrice pour les cellules.
- Représentation schématique d'un cas où cette diffusion sera délétère pour les cellules avoisinantes. (d'après Rossi et al., 2007)

III. Ischémie cérébelleuse

1. Epidémiologie de l'ischémie cérébelleuse

L'ischémie cérébelleuse est estimée à environ 3% des accidents vasculaires cérébraux annuels. Cependant, cette valeur semble être sous estimée car ne sont pas dénombrées comme attaques cérébelleuses, les attaques qui touchent également d'autres régions cérébrales. De plus, l'ischémie cérébelleuse se manifeste initialement par des symptômes communs à d'autres désordres bénins. Les signes caractéristiques d'une ischémie cérébelleuse sont des nausées, des vertiges et des céphalées, voire même une démarche ébrieuse, qui pourraient faire penser aux symptômes d'une simple labyrinthite, entraînant ainsi une difficulté à poser un diagnostic d'ischémie (Edlow et al., 2008). Par contre, l'ataxie des membres est souvent reliée à une atteinte du cervelet, mais elle n'est observée que chez 60% des patients (Edlow et al., 2008). Un indice supplémentaire pour mettre en évidence une ischémie cérébelleuse chez un patient est la présence d'un nystagmus, retrouvé chez environ 50% des patients et qui correspond à des troubles oculaires se traduisant par des mouvements d'oscillations involontaires et saccadés des globes oculaires (Edlow et al., 2008). Le manque de tests cliniques spécifiques de cette pathologie peut avoir des répercussions très importantes, notamment lors d'un diagnostic tardif de l'ischémie cérébelleuse. En effet, le cervelet est une structure particulièrement sensible à l'œdème, comme le montre l'observation clinique chez l'homme (Amarenco et al., 1990), mais aussi les expérimentations chez la souris. En effet, il est montré que le cervelet développe un œdème plus rapidement que le néocortex ou le striatum, suite à un choc hypoosmotique *in vivo* (Amiry-moghaddam et al., 2004). Il est important de remarquer, que même si en général le cervelet est moins atteint par les attaques ischémiques que le reste de l'encéphale, l'œdème cérébelleux a des conséquences qui peuvent être dramatiques, étant donné qu'il peut induire une compression du tronc cérébral (Kase et al., 1993 ; Kelly et al., 2001 ; Edlow et al., 2008). Il s'agit d'une menace vitale compte tenu de la présence à ce niveau des structures bulbares qui régulent la respiration, l'activité cardiaque et la vaso-motricité.

L'imagerie cérébrale reste le meilleur moyen pour confirmer une suspicion d'infarctus cérébelleux. Le scanner peut être utilisé, mais seule l'imagerie par résonance magnétique (IRM) permettra d'avoir une information complète sur la situation du patient, car beaucoup plus sensible que la tomographie (Edlow et al., 2008). Même s'il ne s'agit pas de l'AVC le plus fréquent, les conséquences dramatiques qu'entraîne une attaque cérébelleuse ont conduit les chercheurs à mener des recherches sur cette pathologie. Quelques études ont été conduites sur des cohortes de patients.

2. Etudes réalisées chez l'homme

Les études menées chez l'homme sur les attaques cérébelleuses remontent déjà à quelques années, et ont permis de dresser le portrait clinique et anatomique de l'infarctus cérébelleux. Ces études, principalement d'imagerie, réalisées chez les patients mettent en évidence différents « profils d'ischémie cérébelleuse » en fonction des vaisseaux touchés. Cela explique en partie la complexité du diagnostic et la variabilité des symptômes (voir chapitre

précédent). En effet, le cervelet est vascularisé par trois artères principales, l'artère cérébelleuse postérieure inférieure, l'artère cérébelleuse antérieure inférieure et l'artère cérébelleuse supérieure qui alimentent différentes zone du cervelet (Figure 25).

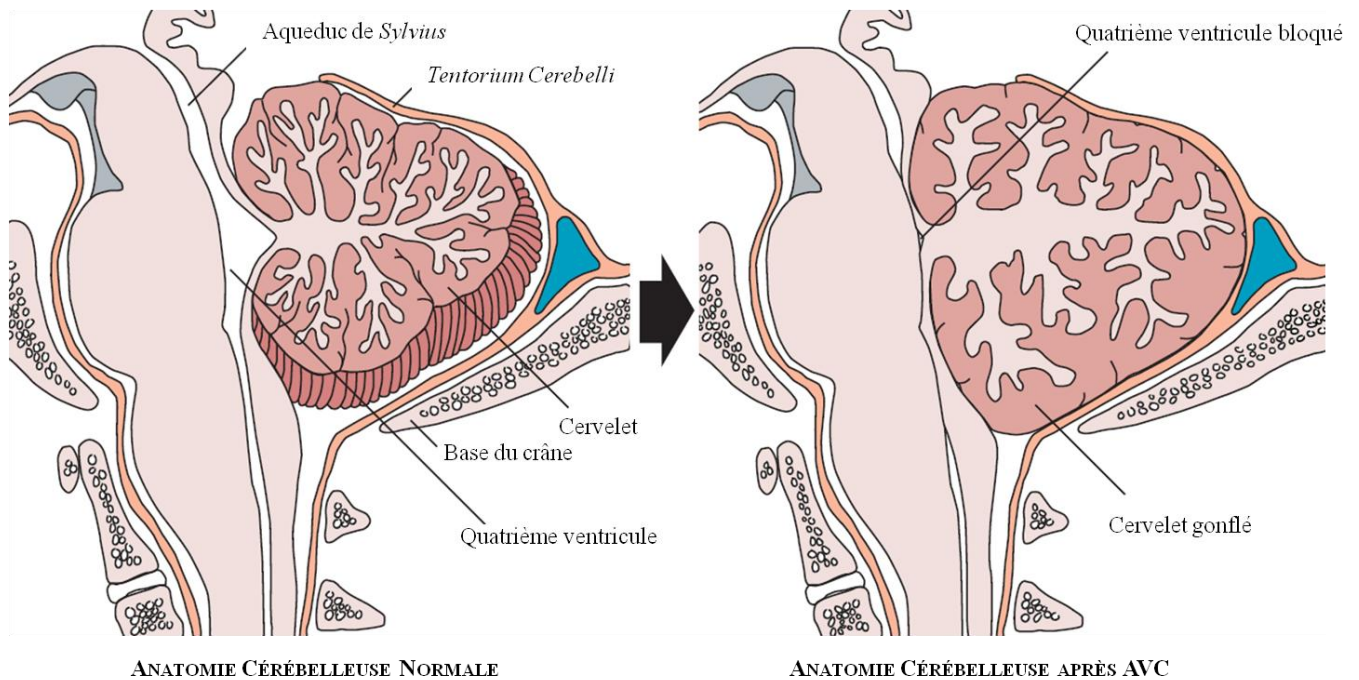


Figure 25 : Comparaison anatomique du cervelet avant et après un AVC.
(d'après Edlow et al., 2008)

Une étude réalisée chez 33 patients ayant subi un infarctus dans le territoire de l'artère cérébelleuse supérieure montre divers symptômes : coma (8/33), tétraplégie suite à la compression œdémateuse du tronc cérébral (11/33), mais également signes de troubles du réflexe vestibulo-oculaire (9/33) (Amarenco et al., 1990). Par contre, dans d'autres études cliniques, une attaque au niveau de l'artère cérébelleuse postérieure inférieure, un gonflement important du cervelet entraînant un œdème important, a été observé (Kase et al., 1993). L'augmentation de la taille du cervelet a pour conséquence une diminution, voire d'un blocage du quatrième ventricule (Figure 25), pouvant aller jusqu'à provoquer une hydrocéphalie (Kase et al., 1993 ; Edlow et al., 2008). Dans certains cas extrêmes, la compression de la colonne vertébrale à la suite de l'œdème a conduit les patients à la mort (Kase et al., 1993). Il semble donc nécessaire de localiser le plus rapidement possible le lieu précis de l'AVC dans le but d'avoir la meilleure approche thérapeutique possible (Kase et al., 1993). Cependant, l'ensemble de ces études princeps, riches en informations épidémiologiques et déterminant les principaux symptômes chez l'homme, ne renseigne pas

sur les différents mécanismes cellulaires conduisant à la mort neuronale, ou au développement de l'œdème.

Par la suite, afin de comprendre les mécanismes cellulaires conduisant à la mort cellulaires suite à une attaque cérébelleuse, de nombreuses recherches fondamentales ont été conduites sur des modèles animaux.

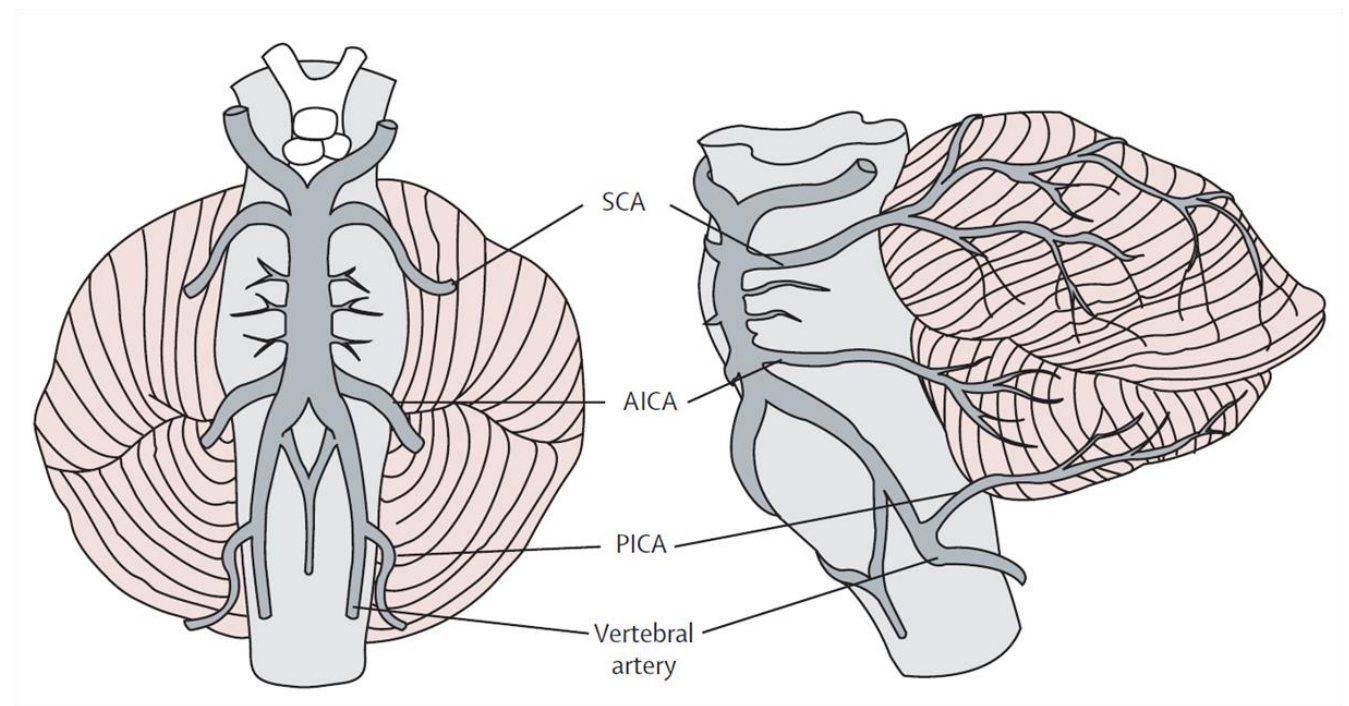


Figure 26 : Représentation de la vascularisation cérébelleuse normale

Le cervelet est vascularisé par trois paires d'artères principales. L'artère cérébelleuse postérieure inférieure (PICA) qui dérive de l'artère vertébrale distale. L'artère cérébelleuse antérieure inférieure (AICA) qui dérive de l'artère basilaire proximale. L'artère cérébelleuse supérieure (SCA) qui dérive de l'artère basilaire distale. De façon générale, les artères cérébelleuses vascularisent également des portions de tronc cérébral. (d'après Edlow et al., 2008)

3. Travaux effectués sur le cervelet

En comparaison avec certaines autres structures cérébrales, telles que l'hippocampe par exemple, le cervelet est beaucoup moins étudié, alors qu'en cas d'atteinte de cette structure, les neurones de Purkinje sont parmi les types cellulaires les plus sensibles du système nerveux central (Fonnum et Lock, 2000 ; Kelly et al., 2001 ; Ardeshiri et al., 2006). Ce manque d'information est problématique car les nombreuses études réalisées dans le cerveau ne permettent pas forcément d'extrapoler les résultats aux cellules de Purkinje, qui sont des neurones GABAergiques et qui n'expriment pas le même répertoire de protéines

membranaires que les autres populations de neurones étudiés (Mohr et al., 2010). De plus, l'un des principaux problèmes pour la recherche fondamentale sur le cervelet, est qu'il n'existe pas de bons modèles pour simuler *in vivo* une ischémie cérébelleuse chez le petit animal de type rongeur. En effet, la plupart des protocoles classiques d'ischémie réalisés *in vivo* (voir chapitre I-8-a de l'introduction) n'affecte pas ou très peu le cervelet.

a. Réponse de la cellule de Purkinje à l'ischémie

La plupart des études préliminaires réalisées sur les rongeurs a donc été menée grâce à des modèles *in vitro*, tels que les modèles sur tranche de cervelet avec des protocoles de privation d'oxygène et de glucose (OGD) (voir chapitre I-8-b de l'introduction). Les recherches se sont principalement focalisées sur les cellules du Purkinje du cervelet, principaux neurones du cortex cérébelleux, et ont montré une forte implication du glutamate dans les dommages causés à cette population cellulaire, allant jusqu'à une forte nécrose cellulaire (Martin et al., 2000). D'un point de vue électrophysiologique, il a par la suite été confirmé l'implication de la libération du glutamate dans les « dégâts » causés par l'ischémie vis-à-vis des cellules de Purkinje (Hamann et al., 2005). En effet, à la suite d'un épisode ischémique, la cellule de Purkinje va fortement se dépolariser, on parlera alors de dépolarisation anoxique, correspondant à l'enregistrement d'un courant dépolarisant de plusieurs nano-ampères (nA) d'amplitude. Cette réponse est, sur les cellules de Purkinje, entièrement due à l'activation des récepteurs de type AMPA/Kainate (Hamann et al., 2005 ; Brady et al., 2010 ; Mohr et al., 2010). Le glutamate libéré massivement au cours de l'ischémie semble provenir de sources diverses. En effet, le glutamate pourrait être libéré de façon vésiculaire par des mécanismes d'exocytose, suite à l'augmentation de l'excitabilité du réseau. Pour le démontrer, le calcium intracellulaire a été réduit afin de bloquer les mécanismes d'exocytose dépendants du calcium, permettant une réduction du courant induit par l'OGD, mais sans bloquer pour autant l'ensemble de la réponse (Hamann et al., 2005). Le glutamate peut également être en partie libéré par l'inversion des transporteurs du glutamate, renforçant d'autant plus l'augmentation de la concentration du glutamate extracellulaire. Cette inversion impliquerait les transporteurs au glutamate situés sur les neurones et non ceux situés sur les astrocytes (Hamann et al., 2005). En revanche, une étude récente semble montrer que les astrocytes entourant les cellules de Purkinje, les cellules de Bergmann, pourraient également libérer du glutamate au cours de l'ischémie, via une acidification de leur milieu intracellulaire (Beppu et al., 2014). En effet, en utilisant une technique innovante d'optogénétique, il a été montré que l'acidification du milieu intracellulaire durant l'ischémie, notamment via la production excessive de lactate, conduirait à l'ouverture de conductances anioniques sur les cellules de Bergmann, par lesquelles le glutamate serait libéré (Beppu et al., 2014 ; Sloan et al., 2014). Même si les mécanismes de libération du glutamate par les cellules de Bergmann au cours de ce phénomène ne sont pas encore complètement décrits, ces résultats laissent imaginer que le contrôle du pH astrocytaire au cours de l'ischémie pourrait être une piste thérapeutique intéressante à explorer. Cependant, le glutamate libéré au cours de l'ischémie ne semble pas être le seul acteur impliqué dans la mise en place des réponses de cellule de Purkinje. En effet, on observe également une forte libération de GABA qui permet de retarder le développement

de la dépolarisation anoxique sur la cellule de Purkinje (Kelley et al., 2008 ; Brady et al., 2010).

b. Phénomène du swelling

Au cours de nombreuses études visant à mimer l'ischémie par l'OGD, un gonflement important des tissus dans de nombreuses structures centrales, telles que l'hippocampe, le cortex ou encore le striatum (Jarvis et al., 2001 ; Joshi et Andrew, 2001 ; Allen et al., 2004 ; Anderson et al., 2005) a été observé. Cependant, peu d'études sont disponibles sur le cervelet. Ce phénomène est qualifié de phénomène du « swelling » et correspond à ce qui est observé *in vivo*, à savoir la mise en place d'un œdème avec potentiellement des conséquences dramatiques sur les patients (voir chapitre I-6-d de l'introduction). Une fois encore, les résultats obtenus dans d'autres structures sont difficilement transposables au cervelet. En effet, dans l'hippocampe, il a été montré que le swelling était exacerbé par l'entrée de Cl⁻ dans les cellules, via l'activation des récepteurs GABA_A (Allen et al., 2004). En revanche, le blocage de ces récepteurs ne permet pas de limiter le phénomène du swelling dans le cervelet (Brady et al., 2010). Réduire ce phénomène pourrait être une piste thérapeutique très intéressante pour tenter de limiter les dommages cellulaires.

c. Diversité des résultats

La diversité des résultats, voir même certains résultats contradictoires observés dans la littérature, peuvent parfois être expliqués par des différences expérimentales. En effet une étude intéressante a été réalisée en faisant varier différents paramètres expérimentaux, afin de déterminer ceux qui pouvaient influencer les résultats. Il s'agit d'une étude sur l'impact d'un épisode ischémique provoqué par l'OGD sur la cellule de Purkinje (Mohr et al., 2010). Contrairement à ce qu'on aurait pu imaginer, il ne semble pas y avoir de différence liée au genre, c'est-à-dire que les hormones sexuelles de la femelle ne semblent pas être bénéfiques pour les cellules de Purkinje, suite à une ischémie. Même si par ailleurs une étude réalisée sur culture de neurones a montré un effet protecteur de la progestérone sur les cellules de Purkinje (Ardehshiri et al., 2006). En revanche, l'âge des animaux et la température modifie considérablement ces résultats. En effet, le jeune animal semble être moins sensible à l'ischémie, tout en ralentissant la diminution de la concentration d'ATP intracellulaire dans la cellule de Purkinje. Il semble donc plus opportun de travailler chez l'animal adulte lorsqu'on cherche à étudier les effets de l'ischémie, cette pathologie touchant majoritairement une population vieillissante chez l'homme. Par contre, cette remarque exclut les recherches réalisées afin de comprendre la mécanistique des AVC chez les nouveaux nés car dans ce contexte il serait tout à fait justifié de travailler chez un animal modèle jeune. Concernant la température, il s'agit d'un facteur très important à prendre en compte, et qu'il faut contrôler au cours des différentes expérimentations. Cette étude montre donc des différences de cinétiques importantes en fonction de la température. A température physiologique, les mécanismes cellulaires de réponses à l'ischémie sont plus rapides qu'à température ambiante.

IV. Glie de Bergmann

1. Introduction

Les cellules de Bergmann sont les astrocytes principaux et les mieux caractérisés du cortex cérébelleux. Elles doivent leur nom à Karl Bergmann qui a été le premier, en 1857, à localiser ces prolongements radiaires dans la couche moléculaire par des techniques histologiques. Cependant, quelques années plus tard, Camillo Golgi fut le premier à comprendre qu'il s'agissait bien de cellules gliales (Figure 27). C'est pour cette raison que pendant longtemps, les cellules de Bergmann ont été appelées « cellules épithéliales de Golgi ».

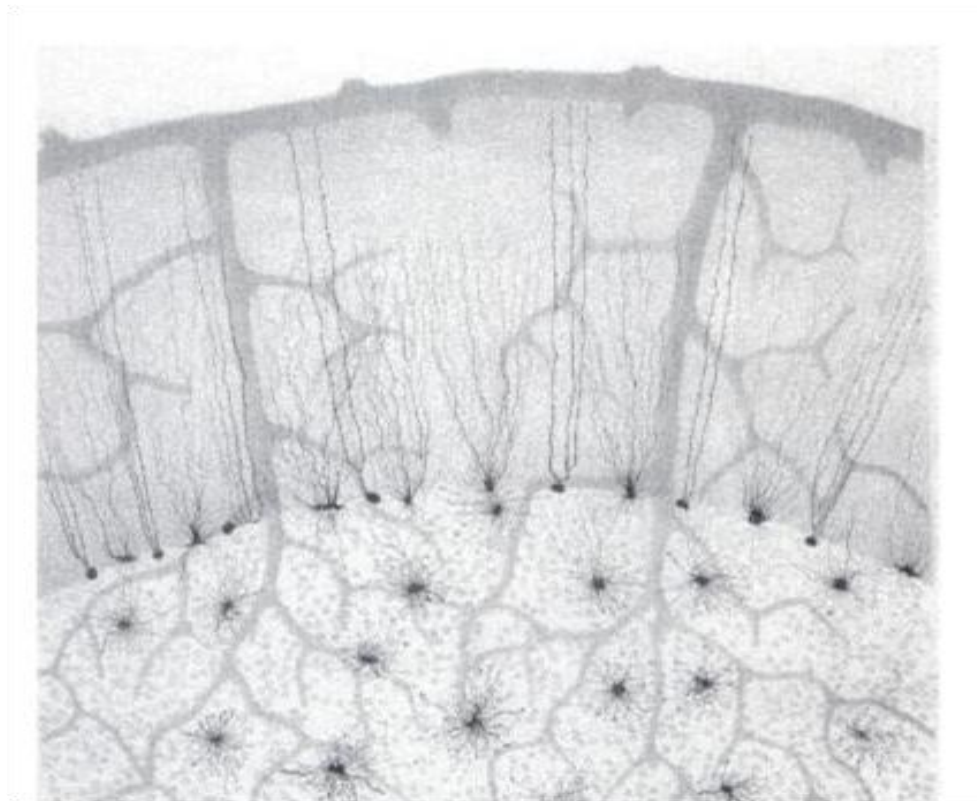


Figure 27 : Visualisation de la cellule de Bergmann au sein du cortex cérébelleux

Coupe vertical d'un cervelet humain illustrant la morphologie radiaire de la glie de Bergmann (d'après Golgi, 1894).

Le corps cellulaire des cellules de Bergmann se situe au niveau de la couche des cellules de Purkinje, et possèdent de longs prolongements radiaires traversant l'ensemble de la couche moléculaire (Figure 27 & 28), ce qui en fait un astrocyte avec une particularité morphologique singulière.

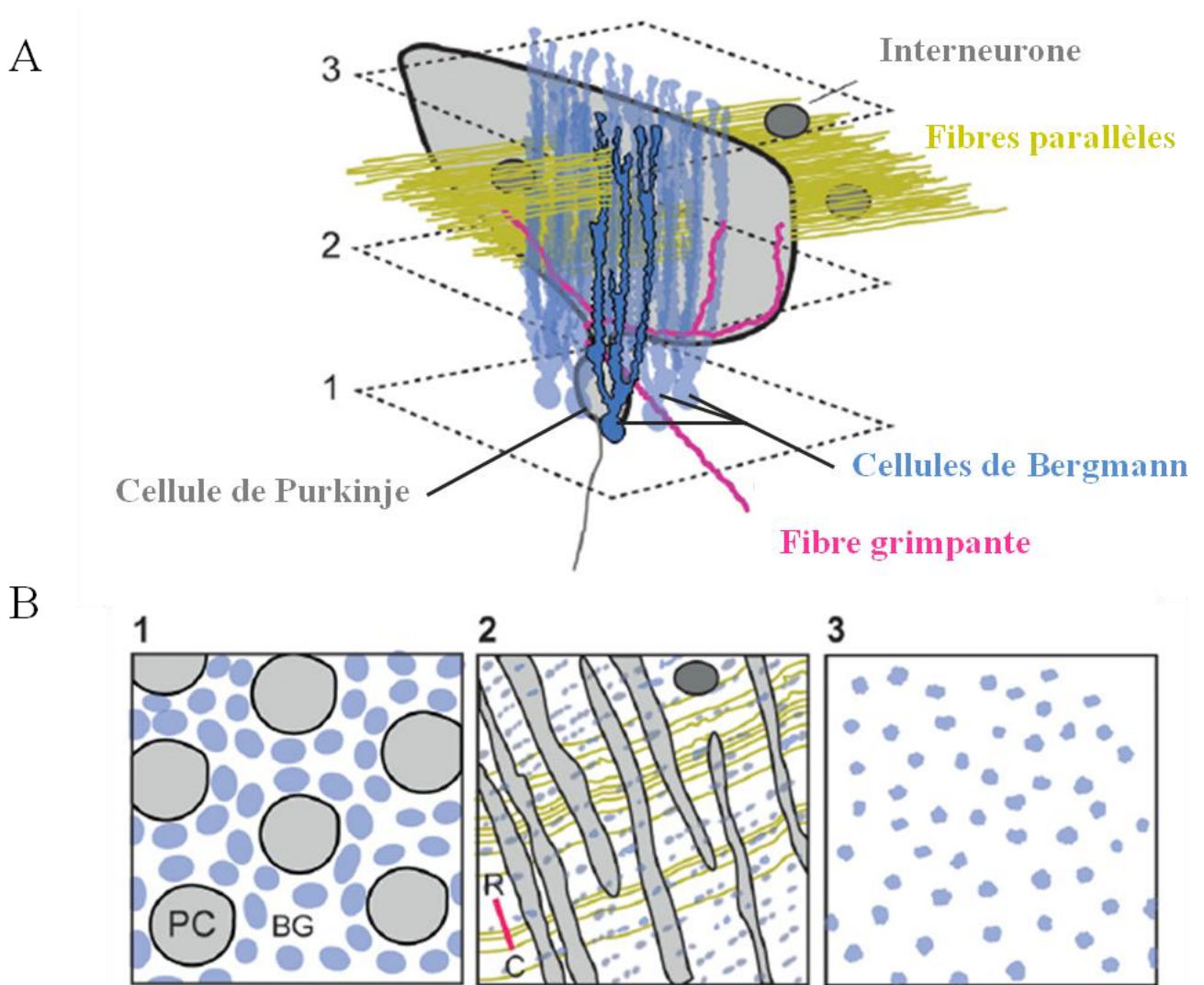


Figure 28 : Représentation schématique du positionnement des cellules de Bergmann autour d'une cellule de Purkinje

- A. Organisation du cortex cérébelleux dans le plan parasagittal, permettant de visualiser l'organisation des cellules de Bergmann autour d'une cellule de Purkinje, ainsi que les prolongements au sein de la couche moléculaire.
- B. Visualisation de cette organisation en plan coronal à différents niveaux de la couche moléculaire. (1) Au niveau de la couche des cellules de Purkinje, sont retrouvés les corps cellulaires des cellules de Purkinje et ceux des cellules de Bergmann. (2) Au niveau de la couche moléculaire, les fibres parallèles forment les synapses en passant avec les cellules de Purkinje, entourées par les prolongements radiaires des cellules de Bergmann. (3) La « glie limitante » représente la zone jusqu'à laquelle les pieds des cellules de Bergmann se projettent (d'après De Zeeuw et al., 2015).

En effet, les cellules de Bergmann sont, avec les cellules de Müller de la rétine, les seuls astrocytes conservant des prolongements radiaires à l'âge adulte. Des études de microscopie électronique ont montré que les prolongements de la cellule de Bergmann sont en étroite interaction avec les synapses, que les fibres parallèles et les fibres grimpantes établissent avec les cellules de Purkinje (Xu-Friedman et al., 2001 ; Castejon et al., 2002 ; Riquelme et al.,

2002 ; Figure 29). Au niveau de la couche des cellules de Purkinje, on dénombre environ 8 cellules de Bergmann pour 1 cellule de Purkinje chez le rat adulte, et chaque cellule de Bergmann peut « envelopper » entre 2000 et 6000 synapses environ sur ces cellules de Purkinje (Reichenbach et al., 1995 ; De Zeeuw et Hoogland, 2015).

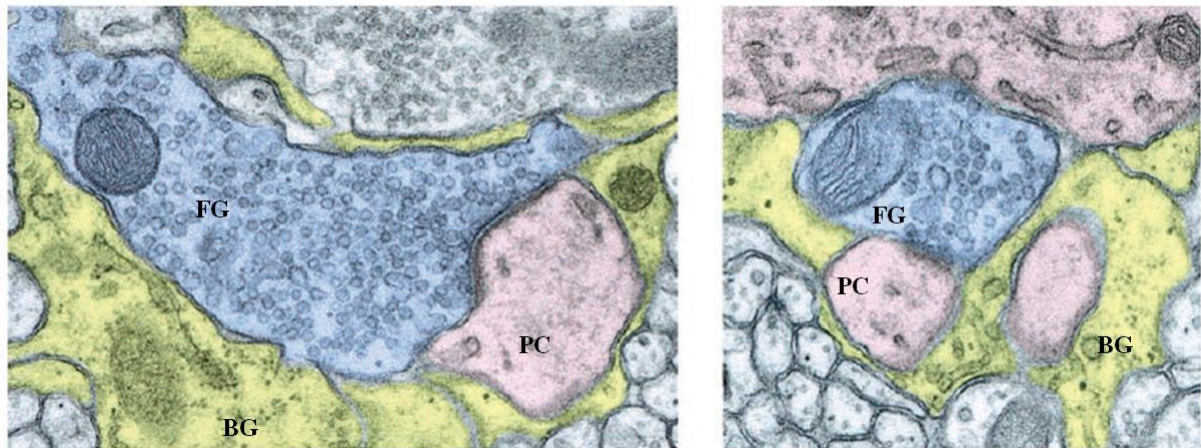


Figure 29 : Visualisation de la cellule de Bergmann au contact de la synapse fibre grimpanche-cellule de Purkinje

Image obtenue par microscopie électronique sur tranche de cortex cérébelleux de rat. L'axone de la fibre grimpanche (FG) est représenté en bleu, contenant de nombreuses vésicules remplies de glutamate. Les épines dendritiques de la cellule de Purkinje (PC) sont représentées en rose, et les prolongements de la cellule de Bergmann (BG) sont représentés en jaune (d'après Xu-Friedman et al, 2001).

D'un point de vue électrophysiologique, la cellule de Bergmann possède les propriétés classiques d'un astrocyte. Son potentiel de membrane, très négatif, compris entre -80mV et -90mV, est dû à l'expression d'une grande densité de canaux K^+ de fuite parmi lesquels on peut citer les canaux Kir4.1 (voir chapitre II-5-c de l'introduction ; Poopalasundaram et al., 2000 ; Higashi et al., 2001). De plus, l'expression de nombreux canaux potassiques de fuite contribue à la faible résistance d'entrée enregistrée sur les cellules de Bergmann (<40M Ω), ainsi qu'à une courbe courant/voltage linéaire chez la souris adulte (Müller et al., 1994). Les cellules de Bergmann sont des cellules non excitables (Bellamy, 2006). On observe également une forte expression de jonctions communicantes qui assurent un véritable couplage électrique et métabolique entre cellules de Bergmann, permettant de former un syncytium astrocytaire (Clark et Barbour, 1997). Ce type de couplage a été observé principalement au niveau des prolongements distaux sur les cellules de Bergmann matures, ceci par des expériences d'électrophysiologie et l'utilisation de marqueurs fluorescents intracellulaires (Müller et al., 1996 ; Clark et Barbour, 1997). Ces jonctions communicantes majoritairement formées par la connexine 43 (Cx43) dans les astrocytes, sont très exprimées sur les cellules de Bergmann (Tanaka et al., 2008). La présence de pannexine de type 1 à également été décrite

sur les cellules de Bergmann (Zappalà et al., 2006). La pannexine 1 permet la formation d'hémi-canaux, qui ne forment pas de jonctions communicantes, mais forment un pore non sélectif au niveau de la membrane plasmique, perméable aux ions et petites molécules (~1kDa, Thompson et al., 2008 ; MacVicar et al., 2010). L'activation des pannexines 1 pourrait permettre aux astrocytes de libérer de l'ATP dans le milieu extra cellulaire (D'hondt et al., 2011).

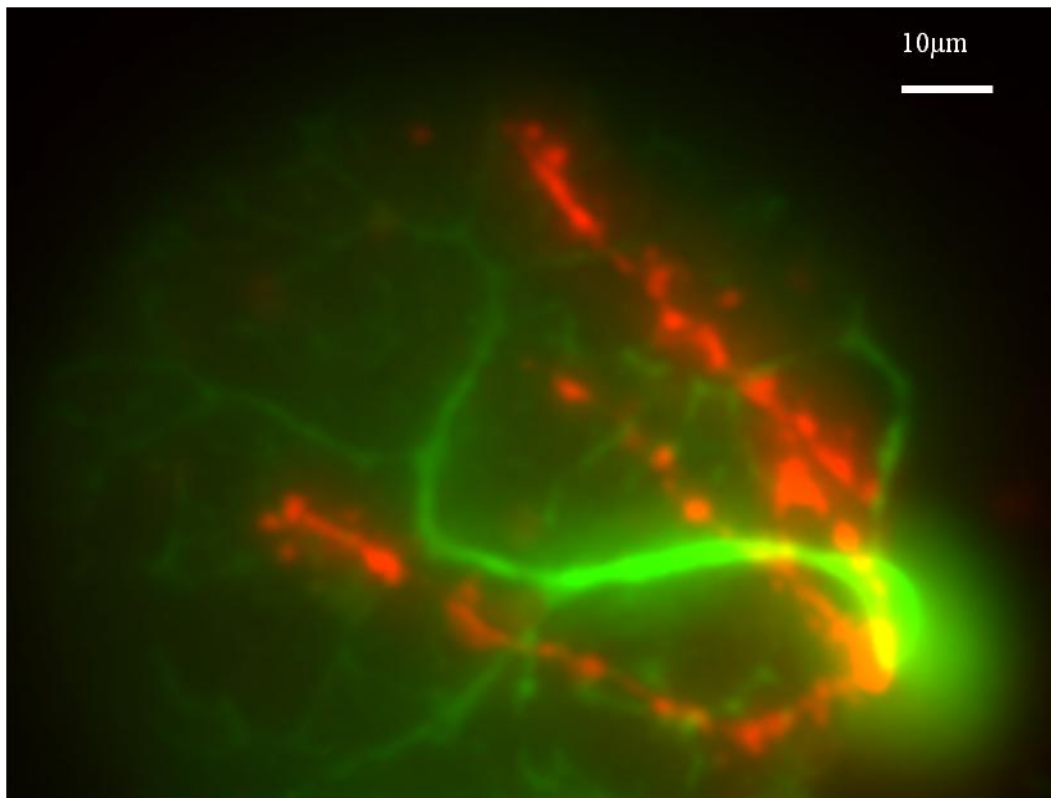


Figure 30 : Visualisation d'une cellule de Bergmann et d'une cellule de Purkinje du cortex cérébelleux.

Double marquage d'une cellule de Purkinje chargée avec du Lucifer Yellow (vert) et d'une cellule de Bergmann chargée avec de l'Alexa 555 (rouge). Les prolongements astrocytaires sont localisés au voisinage d'une large proportion de l'arbre dendritique de la cellule de Purkinje (source personnelle).

La cellule de Bergmann exprime également un large répertoire de récepteurs fonctionnels sensibles aux neurotransmetteurs. On retrouve des récepteurs AMPA dépourvus de la sous-unité GluR2 et donc perméables au Ca^{2+} (Geiger et al., 1995), ainsi que des récepteurs Kainate (Müller et al., 1992). On retrouve également une expression importante de transporteur du glutamate de type GLAST et GLT-1 (Rothstein et al., 1994 ; Takatsuru et al., 2006 ; Piet et al., 2007) impliqués dans la recapture du glutamate (Voir chapitre II-5-e de l'introduction). L'expression de récepteur GABA_A a aussi été identifiée (Müller et al., 1994 ; Riquelme et al., 2002), ce qui est en accord avec la présence de prolongements de la glie de

Bergmann au niveau des interneurons GABAergiques de la couche moléculaire (Castejon et al., 2002). On retrouve également sur la cellule de Bergmann l'expression de transporteurs du GABA permettant la régulation du GABA extracellulaire (Barakat et al., 2002). L'ensemble de ces données de la littérature montrent bien que la glie de Bergmann est équipée d'une large palette de transporteurs et de récepteurs, qui lui permet de « ressentir » la transmission excitatrice et inhibitrice. De plus, il a également été démontré la présence de récepteurs purinergiques sensibles à l'ATP. En effet, plusieurs études ont permis de mettre en évidence la présence de récepteurs P2Y fonctionnels (Kirischuk et al., 1995 ; Kulik et al., 1999) dont l'activation entraîne la libération de Ca^{2+} des réserves intracellulaires. Ces récepteurs sont physiologiquement activés lors de la stimulation électrique des fibres excitatrices afférentes de la couche moléculaire (Bierlein et al., 2006 ; Piet et al., 2007). Par ailleurs, au sein du laboratoire, les travaux de thèse de Samia Habbas, ont mis en évidence la présence sur les cellules de Bergmann de récepteurs purinergiques de type P2X7 fonctionnels, dont l'activation est associée à des augmentations de Ca^{2+} intracellulaire dans la cellule de Bergmann (Habbas et al., 2011). Il reste néanmoins à comprendre l'implication fonctionnelle de ces récepteurs ionotropiques au sein du cortex cérébelleux dans des conditions normales et/ou pathologiques.

2. Principales fonctions des cellules de Bergmann

La cellule de Bergmann a été beaucoup étudiée, ce qui a permis de mettre en évidence de nombreuses fonctions pour ces astrocytes radiaires du cortex cérébelleux. Dans un premier temps, la glie de Bergmann a été décrite pour son rôle dans le développement du cervelet, et sa participation à la migration des cellules granulaires de la couche moléculaire externe vers leur destination finale, dans la partie plus profonde du cortex cérébelleux : la couche granulaire interne (pour revue : Bellamy, 2006).

De plus, les cellules de Bergmann participent à l'intégrité structurelle et fonctionnelle du réseau cérébelleux. En effet, ces cellules gliales expriment des récepteurs AMPA dépourvus de la sous unité GluR2, leur conférant une perméabilité au calcium importante (Geiger et al., 1995). La modification génétique de ces récepteurs par injection virale de l'ADN codant la sous unité GluR2 entraîne une rétraction des prolongements des cellules de Bergmann entourant les épines dendritiques des cellules de Purkinje, limitant ainsi la recapture du glutamate à la fente synaptique (Iino et al., 2001). De plus, une multi-afférentation des cellules de Purkinje par les fibres grimpantes a également été remarquée (Iino et al., 2001). Ces données importantes ont, plus récemment, été validées par une étude *in vivo* où la délétion des récepteurs AMPA perméables au Ca^{2+} entraîne chez la jeune souris une rétraction des prolongements de la cellule de Bergmann, ainsi qu'un retard dans la formation des synapses glutamatergiques au niveau des cellules de Purkinje (Saab et al., 2012). Ces changements physiologiques et structuraux s'accompagnent également de déficits de la coordination motrice fine indispensable pour la rapidité et la précision des mouvements (Saab et al., 2012).

Comme de nombreux astrocytes (Chapitre II-5 de l'introduction), les cellules de Bergmann sont impliquées dans la recapture du glutamate extracellulaire. Dans le cervelet, le glutamate libéré par les fibres parallèles, au niveau des synapses qu'elles établissent avec les épines dendritiques des cellules de Purkinje peut être recapté par les transporteurs de type GLAST et GLT1 des cellules de Bergmann (Clark et Barbour, 1997 ; Bergles et al., 1997) et par les transporteurs de type EAAT4 présents sur les cellules de Purkinje (Takayasu et al., 2005) (Figure 31). Ces transporteurs électrogènes vont permettre la recapture du glutamate grâce aux gradients de Na^+ , K^+ et H^+ . L'action des transporteurs du glutamate des cellules de Bergmann est de limiter l'activation et la désensibilisation des récepteurs AMPA des cellules de Purkinje (Takayasu et al., 2005), mais aussi de réguler la cinétique des courants post synaptiques excitateurs (EPSCs) médiés par les récepteurs AMPA (Marcaggi et al., 2003). De plus, la présence des transporteurs GLAST à la synapse entre fibres grimpantes et cellules de Purkinje limite le « débordement » du glutamate (Takayasu et al., 2005 ; Takayasu et al., 2006). Cette fonction importante empêche que le glutamate libéré à fortes concentrations par l'activation d'une fibre grimpante puisse activer les récepteurs AMPA des cellules de Purkinje voisines (Takayasu et al., 2006). De plus, il est intéressant de noter que l'entrée de Na^+ à travers les transporteurs du glutamate pourrait être couplée à la capture du glucose et à la libération de lactate indiquant un lien important entre l'activité synaptique glutamatergique et l'apport énergétique (Deitmer, 2000).

Par ailleurs les cellules de Bergmann jouent un rôle important de support métabolique pour les cellules de Purkinje. En effet, des études sur tranches de cervelet de souris montrent que les cellules de Bergmann ont une capacité à transporter et métaboliser le glucose beaucoup plus importante et rapide que les neurones de Purkinje, suggérant un rôle important de ces astrocytes dans les apports énergétiques vers les neurones (Barros et al., 2009 ; Jakoby et al., 2014).

Les cellules de Bergmann sont également impliquées dans le contrôle de l'homéostasie ionique, et particulièrement celle du K^+ (Hounsgaard et al., 1983). Leur potentiel de membrane très négatif et la présence d'un grand nombre de canaux K^+ , comme les Kir, permet le contrôle de la concentration de potassium extracellulaire. De plus, les montées de calcium intracellulaire dans la glie de Bergmann seraient responsables d'une baisse de la concentration de potassium extracellulaire avec par conséquent, un impact sur le potentiel de membrane des cellules de Purkinje avoisinantes (Wang et al., 2012, voir chapitre II-5-c de l'introduction). Ce résultat qui a été en partie reproduit *in vivo* chez la souris anesthésiée, met en évidence un rôle important de la glie de Bergmann dans le contrôle de l'excitabilité des cellules de Purkinje.

Des études ont également montré une implication des cellules de Bergmann dans des phénomènes de plasticité synaptique. L'activation des fibres parallèles génère un courant entrant dans les cellules de Bergmann dû à l'activation des récepteurs AMPA et des transporteurs électrogènes du glutamate (Clark et Barbour, 1997). La plasticité à court comme à long terme du courant AMPA des cellules de Bergmann a été étudiée avec attention, par l'équipe de D. Ogden et T. Bellamy. Ils ont montré que la stimulation des fibres parallèle par deux chocs électriques rapprochés induit une facilitation du courant (paired pulse facilitation :

le deuxième courant à une amplitude plus grande que le premier). L'activation des fibres grimpantes induit en revanche une dépression du courant dépendant des récepteurs AMPA dans les cellules de Bergmann. Ces types de plasticité à court terme sont également caractéristiques de la synapse fibre parallèle – cellule de Purkinje et fibre grimpante – cellule de Purkinje, sauf qu'elles sont beaucoup plus prononcées dans les cellules de Bergmann que dans les cellules de Purkinje (Bellamy et Ogden, 2005).

De plus, la stimulation répétitive, même à faible fréquence (0.1 – 1 Hz) des fibres parallèles ou des fibres grimpantes conduit à une diminution progressive du courant glutamatergique évoqué dans la cellule de Bergmann (Bellamy et Ogden, 2006), et si cette stimulation persiste, la dépression du courant devient irréversible (Balakrishnan et Bellamy, 2009). Cependant, les conséquences de cette inhibition quasi-totale de la libération de glutamate sur la fonction gliale, ne sont pas encore connues.

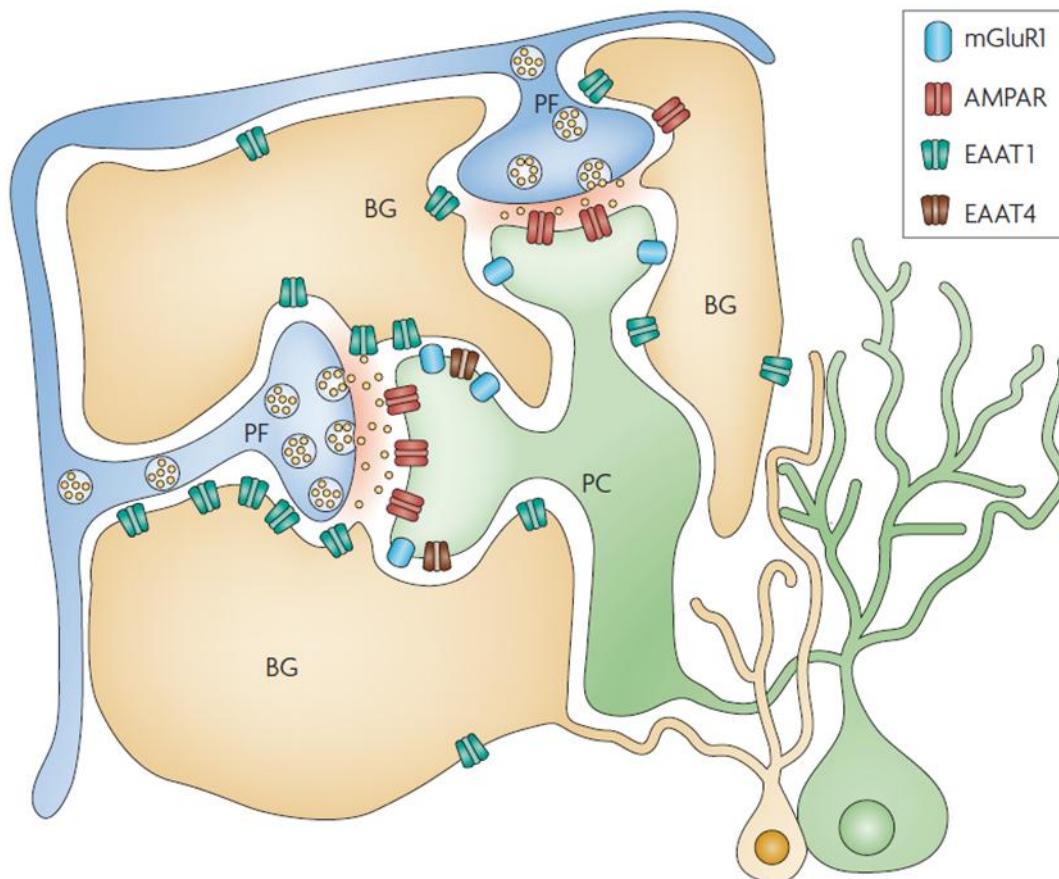


Figure 31 : Représentation de l'interaction cellule de Bergmann - fibre parallèle – cellule de Purkinje

L'expression de nombreux transporteurs du glutamate sur la cellule de Bergmann régule la transmission glutamatergique à cette synapse. (BG: Bergmann Glia - PC: Purkinje Cell – PF: Parallele Fiber) (d'après Tzingounis et al., 2007). Les transporteurs de type GLT1 ne sont pas représentés ici, mais ils sont colocalisés, tout en étant moins exprimés que GLAST à cette synapse (Lehre et Danbolt, 1998).

3. Calcium dans les cellules de Bergmann

Depuis des années, les montées de Ca^{2+} dans les cellules de Bergmann ont été très étudiées, *in vitro*, et plus récemment *in vivo*. Comme cela est observé dans beaucoup d'astrocytes, la cellule de Bergmann présente des montées calciques spontanées. La stimulation électrique des fibres présentes dans la couche moléculaire, entraîne l'augmentation de calcium cytosolique dans les prolongements de la cellule de Bergmann (Grosche et al., 1999 ; Beierlein et Regehr, 2006 ; Piet et Jahr, 2007). Les montées calciques sont en grandes partie dues à la mobilisation du calcium des réserves intracellulaires par l'activation des récepteurs purinergiques métabotropiques de type P2Y (Beierlein et Regehr, 2006 ; Piet et al., 2007). En revanche, la stimulation électrique des fibres grimpanes n'induit pas de montées calciques dans les cellules de Bergmann (Matsui et al., 2004). Des expériences plus récentes réalisées par imagerie bi-photonique *in vivo* confirment ces observations et montrent que la glie de Bergmann possède un répertoire de montées calciques de nature différentes. Notamment une étude sur le rat anesthésié ayant subi une transfection virale qui permet aux cellules de Bergmann d'exprimer un indicateur fluorescent sensible au calcium. Finalement, trois types de signaux calciques ont été décrits dans la glie de Bergmann :

- ✓ Des transitoires calciques localisés dans des compartiments restreints des prolongements astrocytaires n'impliquant que quelques synapses.
- ✓ Des montées calciques spontanées pouvant se propager sous forme de vagues calciques le long des prolongements radiaires de quelques dizaines de cellules (Hoogland et al., 2009 ; Hoogland et al., 2010 ; Mathiensen et al., 2013).
- ✓ Des signaux calciques à plus large échelle qui correspondent à l'activation de centaines de cellules de Bergmann et qui apparaissent pendant une tâche locomotrice (Nimmerjahn et al., 2009 ; Paukert et al., 2014). Ces signaux calciques très étendus sont dus à l'activation des récepteurs ionotropiques au glutamate.

L'analyse des montées calciques dans les cellules de Bergmann a fait l'objet de nombreuse recherche. En revanche, aucune étude n'a décrit la signalisation calcique dans la glie de Bergmann dans des conditions pathologiques de l'ischémie. Au cours de ma thèse, j'ai donc focalisé une partie de mon travail de thèse sur l'étude des variations de calcium cytosolique au cours d'un épisode de privation d'oxygène et de glucose mimant l'ischémie *in vitro* (voir résultats).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Animaux

Ce travail a été réalisé sur des souris mâles adultes (2-3 mois) de fond génétique C57Bl/6J (Janvier France). Certaines expériences ont également été conduites sur des souris génétiquement modifiées déficientes pour le récepteur P2X7 (P2X7^{-/-}, Pfizer ; Habbas et al., 2011) sur fond génétique C57Bl/6J. Toutes les expériences réalisées sur les animaux sont en accord avec les recommandations éthiques du CNRS (Charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale, www.CNRS.fr).

2. Réalisation des tranches de cervelet

L'animal est anesthésié par du 2-Bromo-2Chloro-1,1,1-trifluoroéthane (Sigma) puis sacrifié par décapitation, et le cervelet est rapidement extrait de la boîte crânienne. Le cervelet est alors plongé dans une solution saline physiologique, Bicarbonate-Buffered Solution (BBS, voir tableau 3) froide (1-3°C) supplémentée avec 50µM d'APV. La baisse de la température permet la diminution de l'activité enzymatique et donc du métabolisme cellulaire, et la présence d'APV permet de réduire l'effet excitotoxique du glutamate pendant la phase de coupe. Des tranches para-sagittales de 250µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un vibratome Microm HM 650V (Microm Microtech, France). Les tranches sont ensuite maintenues à température ambiante dans une solution saturée avec du carbogène (95% O₂, 5% CO₂), ce qui permet de maintenir un pH de 7.35 à température ambiante. Un temps de récupération d'au moins une heure est observé à température ambiante, avant tout enregistrement, afin de permettre aux cellules de restaurer leurs réserves énergétiques et leurs gradients ioniques.

3. Enregistrement électrophysiologique en patch clamp

Au moment de l'expérience, une tranche est placée dans la chambre d'enregistrement sous l'objectif du microscope et perfusée en continu avec du BBS (Tableau 3), ceci avec un débit de 2.5ml/min. Les cellules de Bergmann sont identifiées visuellement avec un microscope droit (Axioscope, Zeiss) équipé d'un objectif 63X à immersion. Les cellules de Bergmann sont reconnues dans un premier temps grâce à la localisation de leur corps cellulaire de petite taille dans la couche des cellules de Purkinje. Lors de l'enregistrement en patch-clamp de ces cellules, après obtention de la configuration « cellule-entière », on peut vérifier l'absence de potentiels d'action et une faible résistance de membrane, deux propriétés typiques des astrocytes. Les enregistrements de patch clamp des cellules de Bergmann sont réalisés grâce à un amplificateur Axopatch 200 (Axon Instrument), qui nous permet d'effectuer des enregistrements en voltage imposé (potentiel de commande = 70mV) ou en courant imposé (courant de commande = 0 pA). Les pipettes de patch sont obtenues à partir de capillaires en verre borosilicaté, et ont une résistance de 5 - 7 MΩ, une fois remplies avec la solution

intracellulaire (Tableau 4). Par ailleurs, les enregistrements électrophysiologiques des cellules de Purkinje sont également réalisés en configuration « cellule entière », voltage imposé (-60mV). La résistance des pipettes utilisées est alors comprise entre 4 et 5 MΩ. La résistance en série des cellules de Purkinje est compensée à 75%, et sa stabilité est vérifiée au cours du temps (Rossi et al., 2000 ; Hamann et al., 2005). Tout au long des enregistrements, nous contrôlons les bonnes conditions de patch en mesurant la résistance de la membrane et la résistance en série par un créneau hyperpolarisant de 10mV. L'enregistrement est arrêté lorsque la résistance en série augmente de plus de 20% par rapport à sa valeur initiale. Concernant la cellule de Purkinje, au cours des dépolarisations anoxiques, générant des courants entrants souvent supérieurs à 6nA, il devient alors compliqué de contrôler finement la résistance en série au cours de l'enregistrement (Rossi et al., 2000). Nous avons donc évité de changer la compensation de la résistance en série pendant cette phase aïgue de la dépolarisation membranaire. Les courants évoqués sont enregistrés à l'aide du logiciel Elphy (G. Sadoc, Gif-sur-Yvette) et analysés grâce aux logiciels Clampfit (Axon instruments) et Igor (Wavemetrics).

Tableau 3 : Composition des solutions extracellulaires

SOLUTIONS EXTRACELLULAIRES		
Composition (mM)	BBS	OGD
NaCl	124	124
KCl	3	3
KH ₂ PO ₄	1.15	1.15
MgSO ₄	1.15	1.15
MgCl ₂	-	-
NaHCO ₃	24	24
Glucose	10	-
Sucrose	-	10
CaCl ₂	2	2
Bubbling	O ₂ 95%	N ₂ 95%
Osmolarité (mOsm)	325	325

La charge électrique générée par l'OGD a été quantifiée en calculant l'intégrale du courant tout au long des 30 minutes du protocole d'OGD. Cette procédure a été réalisée sur chaque cellule, afin de pouvoir obtenir des valeurs moyennes dans les différentes conditions d'expérimentation. Afin de pouvoir comparer la charge électrique générée par l'OGD d'une cellule à l'autre, chaque cellule a été normalisée sur 0 pA pendant la période contrôle avant le début du protocole OGD. Ceci a permis de s'affranchir du courant injecté par l'amplificateur pour maintenir chacune des cellules au potentiel de -70mV dans les conditions contrôles.

4. Ischémie *in vitro* : modèle ‘Oxygen and Glucose Deprivation’ (OGD)

Pour reproduire la baisse de glucose et d’oxygène, caractéristique d’un épisode ischémique, on remplace dans le milieu extracellulaire le glucose par du sucrose et l’oxygène par de l’azote. Ce protocole est classiquement utilisé dans la littérature pour étudier l’ischémie sur des préparations *in vitro* (Cimarosti et al., 2008 ; Xie et al., 2008 ; Brady et al., 2010). (Tableau 3). La tranche est maintenue 30 min en condition ischémique avant de revenir en solution BBS. Le retour en solution BBS permet de mimer la reprise de la circulation sanguine observée *in vivo*. Certains protocoles ajoutent des inhibiteurs de la glycolyse pour rendre les effets de l’épisode plus sévères (Hamann et al., 2005) mais ces molécules ne se lavent pas et ne permettent donc pas d’observer le mécanisme de reperfusion. Nous avons fait le choix de ne pas utiliser ces types d’outils pharmacologiques dans nos expériences, car à la suite d’un simple protocole OGD déjà drastique, la récupération du potentiel de membrane des cellules lors du retour en solution contrôle, était gage d’un contrôle précis du protocole expérimental.

Tableau 4 : Composition des solutions intracellulaires

SOLUTIONS INTRACELLULAIRES		
Composition (mM)	Electrophysiologie	Imagerie calcique
K ⁺ -Gluconate	140	140
HEPES	10	10
KCl	6	6
EGTA	0.75	-
MgCl ₂	1	1
Na ₂ -ATP	4	4
Na ₂ -GTP	0.4	0.4
Fluo-4	-	0.1
pH	7.35	7.35
Osmolarité (mOsm)	292	292

5. Imagerie calcique : mesures dynamiques des variations de calcium

Les expériences d’imagerie calcique sont réalisées en ajoutant une sonde calcique fluorescente dans la solution intracellulaire (fluo-4, 100µM, Molecular Probes-Invitrogen, France) (Tableau 4). Après le passage en configuration cellule entière, nous laissons dialyser la sonde calcique pendant 20 minutes au moins dans la cellule de Bergmann avant de

commencer l'acquisition d'images. Des régions marquées en dehors du corps cellulaire de l'astrocyte, sont sélectionnées et illuminées à une longueur d'onde d'excitation de 475 ± 40 nm. L'illumination est transmise par une lampe au xénon de 100 W contrôlée par un obturateur (T32 Uniblitz, Rochester, NY, USA). Les variations de fluorescence, collectées par un objectif 63x à immersion et un filtre de 530 ± 50 nm, sont enregistrées avec une caméra CCD et analysées à l'aide du logiciel Metavue (Molecular Probes). Etant donné que l'exposition prolongée aux longueurs d'onde d'excitation de la sonde fluorescente est très délétère pour la cellule, une image a été acquise toutes les 10 secondes avec un temps d'exposition limité de 75 à 150ms.

Pour l'analyse des données, des régions d'intérêt sont choisies le long des prolongements de la cellule de Bergmann (Figure 32), 2 régions en dehors de la cellule sont systématiquement sélectionnées pour quantifier la fluorescence de base. La moyenne de la fluorescence de base est soustraite de la fluorescence de chaque région d'intérêt. Nous calculons ensuite le pourcentage de la variation relative de fluorescence pour chaque région d'intérêt :

$$\frac{\Delta F_n}{F_0} = \frac{F_n - F_0}{F_0} \times 100$$

F_0 est la moyenne de la fluorescence avant l'OGD pour chaque région d'intérêt et F_n est la fluorescence de la région d'intérêt au temps n. Ainsi, pour chaque région d'intérêt on obtient un $\Delta F_n/F_0$. Les résultats obtenus sur chacune des zones d'intérêt sont ensuite moyennés afin d'obtenir la variation relative moyenne de fluorescence de la cellule de Bergmann étudiée, $\Delta F/F$.

6. Difficulté technique

Les enregistrements en imagerie calcique ont permis d'apporter des éléments de réponse sur les problèmes techniques rencontrés lors des enregistrements électrophysiologiques. En effet, au cours du protocole d'OGD, de nombreux enregistrements se sont dégradés brusquement.

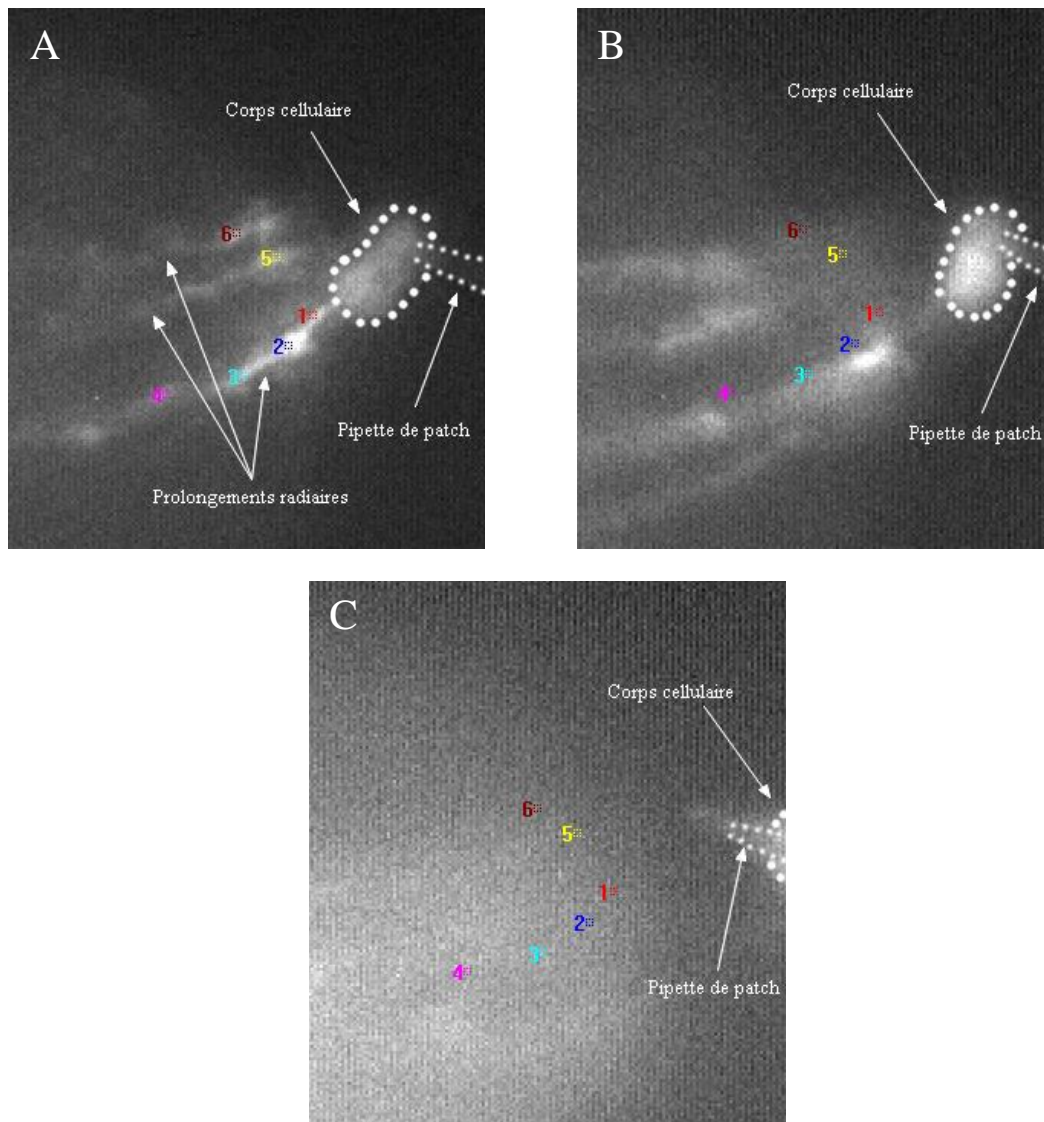


Figure 32 : Exemple d'un enregistrement en imagerie calcique dont l'analyse est rendue impossible par le phénomène du « swelling » qui accompagne l'OGD.

Les images (A) (B) (C) représentent une même cellule de Bergmann à différents instants au cours de l'OGD. La visualisation se fait par imagerie calcique : le Fluo-4 (100 μ M) contenu dans la pipette de patch a diffusé dans la cellule pendant au moins 20 minutes avant le début de l'OGD ($t=0$ min)

- A. (A) $t=0$ min : La pipette de patch se trouve sur le corps cellulaire de la cellule de Bergmann. La mise au point a été effectuée pour une partie des prolongements radiaires. Les carrés colorés (de 1 à 6) correspondent aux zones d'intérêt utilisées pour quantifier les variations de fluorescence.
- B. (B) $t=15$ min d'OGD. La pipette de patch se trouve toujours sur le corps cellulaire de la cellule de Bergmann malgré un léger déplacement. Au niveau électrophysiologique cela peut se traduire par une augmentation de la résistance en série. Les zones d'intérêt ne se trouvent plus dans leur position initiale, mais il est encore possible de suivre l'évolution de la fluorescence par translation de ces zones.
- C. (C) $t=30$ min d'OGD. La pipette de patch n'est plus sur le corps cellulaire. L'enregistrement électrophysiologique n'est plus possible. En plus du déplacement latéral observé en B, la tranche a « gonflé » et la mise au point n'est plus adaptée pour visualiser les prolongements de la cellule. A ce stade il est devenu impossible de quantifier les variations de fluorescence. La cellule doit être écartée de l'analyse.

Les images présentées sur la figure 32 mettent en évidence d'importants mouvements de la zone éclairée par rapport au plan focal. Dans certains cas, nous avons observé le détachement du corps cellulaire de la cellule enregistrée de la pipette de patch, ce qui met bien évidemment fin à l'enregistrement électrophysiologique. Ces effets contraignants sont dus à un « gonflement » généralisé du tissu nerveux (« cellular swelling », Kahle et al., 2009) qui se manifeste rapidement au cours de l'OGD. L'analyse des résultats en imagerie calcique a donc été affectée par le mouvement de l'image au cours de l'OGD. En effet, pour quantifier les variations de fluorescence il faut définir des zones d'intérêts et y suivre l'évolution de la fluorescence. Il est possible de s'accommoder de légers mouvements latéraux de la tranche par translation des zones d'intérêts, en revanche, les mouvements du plan focal Z ne peuvent pas aisément être compensés et empêchent définitivement l'analyse des données (Figure 32). Nous avons donc cherché à quantifier le gonflement cellulaire pendant l'OGD.

7. Quantification du « swelling »

Le gonflement observé sur les tranches de cervelet à la suite de l'ischémie induite par l'OGD peut être évalué par quantification de la lumière transmise à travers la tranche (Allen et al., 2004). En effet, lors du phénomène du « swelling », l'eau entre dans les cellules, et augmente le volume intracellulaire, ce qui a deux conséquences importantes au niveau de la lumière transmise. D'une part, la membrane plasmique des cellules, composée d'une bicouche lipidique, est distendue. D'autre part, le contenu cytosolique en organites est dilué suite à l'augmentation d'eau dans les cellules. Consécutivement à cela, la lumière rencontre moins d'obstacles sur son chemin, et est moins affectée par le phénomène de diffraction (Figure 33). Ainsi, une augmentation de la lumière transmise à travers la tranche reflète directement une augmentation du « swelling » des cellules.

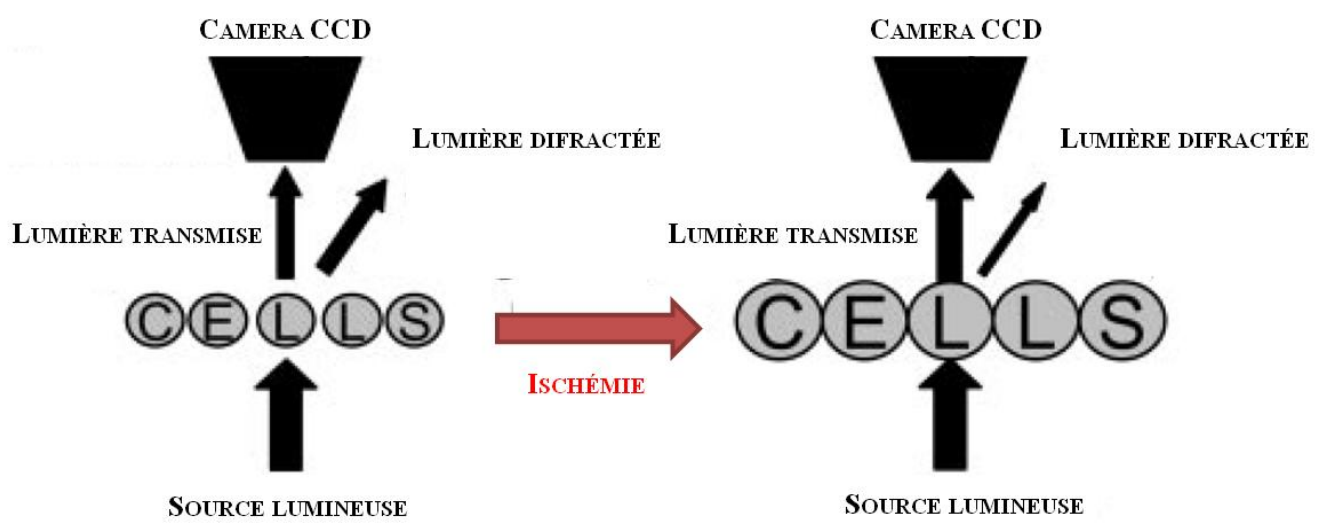


Figure 33 : Représentation schématique de la quantification de la lumière transmise au cours du phénomène de swelling. (d'après Allen et al., 2004)

Au cours d'une même expérience, la source lumineuse est constante, mais peut varier d'une expérience à l'autre. Afin de pouvoir comparer les résultats, les données ont, comme pour les mesures d'imagerie calcique, été normalisées. Un rapport de variation relative de lumière transmise à donc été calculé:

$$\frac{\Delta L}{L} = \frac{(L_n - L_0)}{L_0} \times 100$$

(L₀) est la moyenne de la lumière transmise avant l'OGD et L_n est la lumière transmise relative à l'acquisition au temps n. Nous calculons donc la variation relative de lumière transmise en pourcentage ΔL/L au cours de l'OGD.

8. Enregistrement des concentrations de K⁺ extracellulaire

Les mesures de K⁺ extracellulaires ont été réalisées grâce à la technique des microélectrodes sensibles aux ions. Nous avons utilisé des doubles capillaires (WPI) préparés de la façon suivante : un compartiment à été exposé aux vapeurs de diméthylchlorosilane (Sigma-Aldrich), puis chauffé à 120°C pendant 2 heures. La pointe de ce compartiment « silanisé » est ensuite remplie avec quelques μl d'ionophore perméable au potassium (cocktail B, Sigma-Aldrich). Puis le capillaire est rempli avec une solution de KCl 0.2M ([K⁺]_{int}, Figure 34). La silanisation permet de rendre les parois du capillaire hydrophobes, permettant une meilleure stabilité de la membrane potassique dans ce capillaire. Le deuxième capillaire, non silanisé, est quand à lui rempli avec du BBS afin d'enregistrer le potentiel de champ extracellulaire. L'utilisation d'un amplificateur approprié, à haute impédance, (ION-01M, NPI, Germany) permet l'enregistrement simultané du potentiel de champ extracellulaire ainsi que des variations de potentiel à travers la membrane potassique. L'amplificateur permet également d'enregistrer directement la soustraction de ces deux signaux, afin d'obtenir une mesure des variations de potentiel exclusivement dues aux variations de potassium extracellulaire. Chaque électrode est calibrée avant et après son utilisation avec des solutions de concentration de K⁺ différentes ([K⁺]_{ext} = 4.15mM, 8mM, 20mM, 60mM, 200mM). Ce passage permet de vérifier que les mesures des différences de potentiels trans-membranes potassiques enregistrées suivent bien la loi de Nernst (Figure 34), ce qui permet par la suite de convertir ces variations de potentiel en variations de concentration de K⁺.

$$E_{K^+} = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{[K^+]_{ext}}{[K^+]_{int}} \right)$$

Figure 34 : Potentiel de Nernst pour le K⁺

R = Constante des gaz parfait, 8.31 J.mol⁻¹.K⁻¹

T = Température en °Kelvin (= T(°Celsius) + 273.15)

Z = Valence de l'ion K⁺, +1

F = Constante de Faraday, 96500 C.mol⁻¹

En effet, les ionophores présents dans la membrane artificielle étant sélectivement perméable au K⁺, en conséquence la différence de potentiel trans-membranaire enregistrée suivant la théorie de Nernst, on peut donc calculer les variations de concentration de K⁺ extracellulaire grâce aux mesures de variations de potentiel électrique.

9. Outils pharmacologiques

Au cours de nos études, plusieurs agents pharmacologiques ont été utilisés et appliqués dans le bain de perfusion :

- 2-APB (2-Aminoethyl diphenylborinate) (Sigma-Aldrich): Antagoniste non spécifique des Store Operated Calcium Channel (SOCC)
- A-740003 (Art Molecule-Poitier) : Antagoniste sélectif des récepteurs P2X7
- APV (D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid) (Ascent Scientific) : Antagoniste spécifique des récepteurs NMDA.
- CPA (Cyclopiazonic acid) (Sigma-Aldrich) : Inhibiteur de la pompe calcique du réticulum endoplasmique (SERCA).
- DIDS (4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid disodium salt hydrate) (Sigma-Aldrich) : Bloquant de plusieurs types de canaux anioniques.
- Fluorocitric Acid (Sigma-Aldrich) : Inhibiteur du cycle (tricarboxylic) de Krebs.
- JNJ (3-Fluoro-N-(6,7-dimethoxy-2,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-yl)phenylamine, N-(3-fluorophenyl)-2,4-dihydro-6,7-dimethoxy-Indeno[1,2-c]pyrazol-3-amine) (Sigma-Aldrich): Antagoniste spécifique des récepteurs métabotropiques au glutamate de type mGluR1.
- MPEP (6-Methyl-2-(phenylethynyl)pyridine (Sigma): Antagoniste spécifique des récepteurs métabotropiques au glutamate de type mGluR5.
- NBQX (2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide) (Ascent Scientific) : Antagoniste spécifique des récepteur AMPA/Kaïnate.

- PPADS (4-[[4-Formyl-5-hydroxy-6-methyl-3-[(phosphonoxy)methyl]-2-pyridinyl]azo]-1,3-benzenedisulfonic acid tetrasodium salt) (Abcam): Antagoniste des récepteurs purinergiques P2.
- TBOA (DL-threo- β -Benzyloxyaspartic acid) (Tocris): Inhibiteur des transporteurs du glutamate.
- TEA : (Tétraéthylammonium chloride) (Sigma-Aldrich): Bloquant non spécifique de plusieurs types canaux K^+ .
- TTX (Tetrodotoxin, Ascent Scientific) : Bloquant des canaux sodiques sensibles au potentiel.

10. Analyse statistique

L'ensemble des données est exprimé sous forme « moyenne \pm SEM ». Afin de déterminer la significativité de nos résultats, deux types de test ont été réalisés. Pour des échantillons dont l'effectif est supérieur à 10, nous réalisons un test de Student (paramétrique). Tandis que pour les échantillons de taille inférieure à 10, le test de Mann & Whitney (non paramétrique) est choisi. Le seuil de significativité est fixé à $P < 0.05$.

RÉSULTATS

1. Contexte initial de mon projet de thèse

Avant mon arrivée au laboratoire, les travaux de thèse de Samia Habbas, avaient mis en évidence la présence sur les cellules de Bergmann de récepteurs purinergiques ionotropiques de type P2X7, dont l'activation était associée à un courant dépolarisant et à une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire. En effet, l'application d'ATP à fortes concentrations, ou de Bz-ATP induit un courant dépolarisant, fortement inhibé par les bloquants pharmacologiques spécifiques des récepteurs P2X7, dont l'amplitude est modulée par les ions bivalents présents dans le milieu extracellulaire. De plus, il a été démontré que les agonistes activant les récepteurs P2X7, sont inefficaces sur les cellules de Bergmann issues de souris déficientes pour le récepteur P2X7 (aucun courant entrant détecté, ni aucune augmentation de Ca^{2+} cytosolique). Enfin, les données immunohistologiques ont, en parallèle, appuyées les travaux d'électrophysiologie et d'imagerie Ca^{2+} , en révélant la présence de récepteurs P2X7 au niveau des prolongements des cellules de Bergmann (Habbas et al., 2011).

Les travaux du laboratoire ayant montré que les récepteurs P2X7 n'étaient que peu activés dans des conditions physiologiques (Habbas et al., 2011), il était tentant d'explorer leur activation putative dans des conditions pathologiques telles que l'ischémie, conditions caractérisées par l'augmentation de la concentration d'ATP dans le milieu extracellulaire.

En effet, des expériences menées chez le rongeur, *in vivo*, ont montré que la concentration d'ATP extracellulaire augmente, suite à un épisode ischémique induit par l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (Kharlamov et al., 2002 ; Franke et al., 2006). De plus, il a été montré que le PPADS, un antagoniste à large spectre des récepteurs purinergiques P2Y et P2X diminue la taille des lésions ischémiques et améliore la récupération cognitive et motrice post-ischémique (Lammer et al., 2006 ; Lammer et al., 2011).

Les récepteurs P2X7 sont des récepteurs purinergiques ionotropiques qui ont des propriétés singulières, très différentes des autres sous types P2X (North, 2002) :

- Ils ont une faible affinité pour l'ATP, leur agoniste endogène. En effet, il faut de fortes concentrations d'ATP de l'ordre du mM pour les activer, contre des concentrations beaucoup moins importantes (10-100 μM), pour activer la plupart des autres sous-types P2X.
- Ces récepteurs présentent une faible désensibilisation suite à une exposition à l'ATP : le courant entrant perdure sans diminution pendant toute la durée de l'application de l'agoniste.
- De plus, l'application répétée d'ATP potentialise l'amplitude des courants P2X7-dépendants (Chessell et al., 1997). Cela peut conduire à la formation d'un pore non-sélectif laissant passer des molécules de haut poids moléculaire (jusqu'à 900 Da).
- Enfin, le récepteur P2X7 est inhibé par les ions divalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}) présents dans le milieu extracellulaire (Surprenant et al., 1996). En particulier, pour la cellule de

Bergmann, ces récepteurs sont presque complètement inhibés par des concentrations physiologiques de Mg^{2+} (1mM) et Ca^{2+} (2mM).

Cependant, durant un épisode ischémique, les concentrations extracellulaires en Ca^{2+} et Mg^{2+} diminuent (Kristian et al., 1998 ; Lin et al., 2004). L'ensemble de ces données nous a donc encouragé à explorer la possibilité que les récepteurs P2X7 de la glie de Bergmann pouvaient être activés pendant un épisode ischémique, épisode que nous avons mimé par une privation d'oxygène et de glucose (OGD).

2. Présentation de l'article

Si dans le cortex cérébelleux, les effets d'un épisode ischémique ont déjà été largement décrits dans la littérature en termes de conséquences fonctionnelles sur l'activité des cellules de Purkinje (Hamann et al., 2005 ; Brady et al., 2010 ; Mohr et al., 2010), en revanche rien n'était connu dans ces conditions pathologiques, sur celles des cellules de Bergmann, lorsque j'ai initié mon travail de thèse. L'étude des conséquences d'un épisode ischémique sur la cellule de Bergmann, visant à en déterminer les principaux acteurs moléculaires, a été menée sur un modèle de privation d'oxygène et de glucose (OGD), à l'aide d'approches méthodologiques complémentaires : électrophysiologie, imagerie calcique et mesure des concentrations extracellulaires de K^+ à l'aide de microélectrodes sensibles à ces ions. L'ensemble de l'étude a été réalisées à une température de 31°-33°C pour se rapprocher des conditions physiologiques.

Les expériences de patch clamp et d'imagerie calcique effectuées sur tranches de cervelet de souris adultes ont révélé que les cellules de Bergmann répondent à l'OGD par une dépolarisation progressive de la membrane, ainsi que par une augmentation soutenue de calcium cytosolique. L'utilisation d'antagonistes spécifiques des récepteurs P2X7 (A-740003) ainsi que des souris knock-out pour ce récepteur ($P2X7R^{-/-}$), montre que ces récepteurs ne sont pas impliqués dans la réponse de la cellule de Bergmann dans nos conditions d'expérimentation. A la suite de l'article (chapitre 3 des résultats), je montrerai des expériences supplémentaires effectuées à température ambiante (21-23°C). Ces résultats préliminaires montrent une activation des récepteurs P2X7 au cours de l'OGD. Cet effet température-dépendant sera discuté plus tard dans le manuscrit (chapitre 4 de la discussion).

Un résultat important révélé par mon travail de thèse est que le glutamate, connu pour être libéré durant l'OGD n'affecte pas significativement la réponse de la glie de Bergmann à l'OGD. Ce résultat est surprenant par rapport aux données de la littérature, qui montrent que le glutamate joue un rôle déterminant dans la dépolarisation anoxique des neurones de Purkinje (voir chapitre III-3-a de l'introduction). Nous avons donc voulu réaliser des enregistrements en patch clamp appariés entre les neurones de Purkinje et les cellules de Bergmann, afin de comparer simultanément dans les deux types cellulaires, l'effet des bloquants des récepteurs ionotropiques au glutamate durant l'OGD. En présence de ces bloquants, on a retrouvé une inhibition quasi-totale de la réponse des cellules de Purkinje (Hamann et al., 2005), mais un effet mineur sur le courant et la montée de calcium

intracellulaire des cellules de Bergmann. Parmi les rôles fonctionnels des astrocytes, leur implication majeure dans la recapture du K^+ extracellulaire a été largement décrite. On parle souvent d'implication astrocytaire dans l'homéostasie potassique (chapitre II-5-c de l'introduction). Or, on sait que pendant l'ischémie cérébrale, la concentration de K^+ extracellulaire augmente (chapitre I-6-a de l'introduction). A l'aide de la technique des microélectrodes sensibles aux ions, les enregistrements simultanés du potentiel membranaire de la cellule de Bergmann et de la concentration de K^+ extracellulaire montre une corrélation importante entre ces deux paramètres au cours de l'OGD. Ces résultats suggèrent que le K^+ s'accumule dans l'espace extracellulaire pendant l'ischémie, et que les cellules de Bergmann répondent à cela avec une dépolarisation membranaire importante. Ceci dit, ces résultats n'expliquent que pour une part, l'ensemble de la dépolarisation de la cellule de Bergmann au cours de l'OGD.

Finalement, nos résultats montrent que la montée soutenue de calcium dans le cytosol observée lors de l'OGD, se compose de deux phases. Une phase précoce due à la libération d'ATP dans le milieu extracellulaire qui, via l'activation de récepteurs P2Y, conduit à la libération de calcium des stocks intracellulaires. Et une phase tardive résultant de l'activation de conductance de type SOCC au niveau de la membrane plasmique, ce qui se traduit par une entrée de calcium du milieu extracellulaire.

3. Article

Title:

K⁺ and ATP released during Oxygen and Glucose Deprivation act on cerebellar Bergmann glia physiology

Authors: Helleringer R¹, Chever O², Daniel H¹, Galante M^{1*}

¹Institut des Neurosciences Paris-Saclay, Université Paris-Saclay, Univ Paris-Sud, CNRS, UMR 9197, Orsay, France.

²Institute of Molecular and Cellular Pharmacology, University of Nice Sophia Antipolis, CNRS, UMR 7275, Valbonne, France.

*Corresponding author: Micaela Galante, Pharmacology and Biochemistry of the Synapse, Institut des Neurosciences Paris-Saclay, Université Paris-Sud, bât 430, 91405 Orsay, France. micaela.galante@u-psud.fr.

Number of pages

Number of figures, tables, multimedia and 3D models (separately)

Number of words for Abstract, Introduction, and Discussion (separately)

Conflict of interest

Acknowledgments: We are especially thankful to M. Casado for scientific discussions and to M. Diana and H. McLean for scientific discussion and comments on the manuscript.

R. Helleringer was supported by a fellowship from Région Île de France, 'DIM Cerveau et Pensée'.

Abstract

Astrocytes are glial cells that play a major role in the maintenance of neuronal physiological functions. During brain ischemia, intense energy deficiency induces a complex succession of events including pump failure, acidosis and exacerbated glutamate release. In the cerebellum, glutamate is the principal mediator of Purkinje neuron anoxic depolarisation during episodes of oxygen and glucose deprivation (OGD). However, the response of Bergmann glia, specialized astrocytes that have an intimate and functional interaction with Purkinje neurons, remains elusive. Here, several basic features of Bergmann glia responses to ischemia are analysed. Patch clamp experiments reveal that during OGD Bergmann glial cells develop a large depolarising current that is reversible upon reestablishment of control physiological conditions. Inhibition of glutamate and purinergic receptors affects the OGD-induced current only slightly, whereas ion-sensitive measurements of extracellular K⁺ concentrations importantly reveal that Bergmann glia depolarisations are mainly due to the accumulation of

K^+ in the extracellular space. Furthermore, we also found that increases in the intracellular Ca^{2+} concentration appear in Bergmann glia processes several minutes following OGD. These elevations require, in an early phase, Ca^{2+} mobilization from internal stores via P2Y receptor activation, and, over longer periods, Ca^{2+} entry through store-operated calcium channels.

Our results thus suggest that increases of K^+ and ATP concentrations in the extracellular space are primordial mediators of the cellular depolarisations of Bergmann glial cells following OGD onset. In the cerebellum, glial responses to energy deprivation-triggering events are therefore highly likely to follow largely distinct rules from those of their neuronal counterparts.

Introduction

The structural and functional integrity of the brain is strictly dependent on the energy supply originating from continuous blood irrigation.

Glucose and oxygen availability can be severely compromised during ischemia, with multifaceted consequences on tissue health that develop gradually along an ischemic episode. One of the primary effects of ischemia is a decrease of metabolic ATP concentrations. The deriving inhibition of ATP-ases activity alters ionic concentration gradients, in particular leading to accumulation of both K^+ and neurotransmitters in the extracellular space and to intracellular Ca^{2+} increases, events that can conjointly induce cell death.

Over recent years evidence has been accumulating involving glial cells in cerebral ischemia. On the one hand astrocytes are deemed to play a neuroprotective role as long-lasting glycogen stores, growth factors secreting elements and antioxidant agents (for review Nedergaard and Dirnagl, 2005; Rossi et al., 2007). Alternatively, astrocytes have also been found to contribute to tissue damaging by contrasting the regeneration of injured axons through the glial scar (Silver and Miller, 2004; Pekny and Nilsson, 2005), by releasing toxic amounts of radicals (Gibson et al., 2005) and/or by contributing to brain tissue swelling (Liang et al., 2007; Kimelberg, 2005).

Overall, the exact role of astrocytes in the complex succession of pathological events following an ischemic episode still remains elusive. A full understanding of the mechanisms underlying ischemic responses in astrocytes is thus fundamental to provide new insight in ischemia pathology.

In the cerebellum, anoxic depolarizations are observed in Purkinje cells during Oxygen and Glucose Deprivation (OGD) episodes (Hamann et al., 2005; Mohr et al., 2010). These are triggered mainly by AMPA receptor activation following both glutamate exocytosis, reversal of glutamate transporters (Hamann et al., 2005) and H^+ -dependent glial glutamate release (Beppu et al., 2014). The impact of an ischemic event on cerebellar

astrocytes has instead not been studied so far. In particular, Bergmann glial cells are radial astrocytes anatomically and functionally associated to Purkinje neurons. Their processes are closely juxtaposed to Purkinje cell spines (Xu-Friedman et al., 2001; Castejon et al., 2002) thus contributing to glutamate uptake (Bergles et al., 1997; Clark and Barbour, 1997; Takayasu et al., 2005) and to extracellular K⁺ and water homeostasis (Wang et al., 2012, Hirrlinger et al., 2008). In view of their pivotal role in cerebellar physiology, we here focus on the impact of ischemia on Bergmann glial cells.

We used a well established model of OGD, (Rossi et al., 2000) in *in-vitro* cerebellar slices. Our results show that Bergmann glia responds to OGD with reversible membrane depolarizations and sustained intracellular Ca²⁺ increases. Interestingly, glutamate released during OGD has only minor effects on Bergmann glia, whereas extracellular ATP increases elicit Ca²⁺ mobilizations from internal stores. Finally, using the ion-sensitive microelectrode technique we show that Bergmann glia membrane depolarizations are mainly due to increases in extracellular K⁺ concentration following OGD onset.

Our results provide important insight into the cellular mechanisms accompanying ischemic injuries to brain structures, and suggest a clear divergence between neuronal and glial OGD-related responses in the cerebellum.

Materials and methods

Preparation of cerebellar slice:

Cerebellar slices were prepared from C57Bl/6J mice, 2-3 month old. Animals were anesthetized by 2-bromo-2-chloro-1,1,1-trifluoroethane before decapitation. Parasagittal cerebellar slice (250µm) were obtained from the vermis with vibratome Microm HM 650V (Microm Microtech, France) in an ice-cold Bicarbonate Buffered Solution (BBS) saturated with 5% CO₂ and 95% O₂ and supplemented with APV (50µM) to prevent glutamate excitotoxicity during slicing. The composition of BBS is (in mM): 124 NaCl, 3 KCl, 1.15 KH₂PO₄, 1.15 MgSO₄, 24 NaHCO₃, 10 Glucose, 2 CaCl₂ (osmolarity: 330 mOsm et pH 7.35). Slices were kept in BBS at room temperature then placed in the recording chamber and continuously superfused with BBS at a rate of 2.5ml/min. Experiments were carried out at a temperature comprised between 29°C and 31°C. Oxygen and Glucose deprivation (OGD) was obtained substituting glucose with 10mM sucrose in the BBS composition and saturating the solution with 5% CO₂ and 95% N₂.

Electrophysiology:

Patch-clamp whole-cell recordings were performed with an Axopatch 200 and an Axopatch 200B amplifier (Axon instruments). Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries with a horizontal puller (Sutter Instrument) and have a resistance of 5-7 MΩ when filled with the following intracellular solution (mM): K-gluconate 140, MgCl₂ 1, KCl 4,

Hepes 10, EGTA 0.75, Na₂ATP 4, NaGTP 0.4 (osmolarity 300 mosm and pH 7.35). The stability of the series resistance was routinely checked by delivering brief (150 ms) hyperpolarising pulses (-10mV). Recordings were interrupted when the series resistance increased by more than 20% of the initial value and this parameter was always compensated in recordings from Purkinje neurons. Bergmann cells were held at -70mV and Purkinje neurons at -60mV. Liquid junction potential was not compensated. The I_{OGD} charge was calculated as the integral of the current (baseline adjusted to zero) during the whole 30min of the OGD protocol. This integral was calculated by Igor routines (WaveMetrics). In some experiments we lose the recording before the end of OGD. In that case we measured only the time to the first peak amplitude and not I_{OGD} area. This explains why in the result section the number of cells in the statistics (n) is not always homogeneous. All drugs were added to the extracellular solution. Stocks of A-740003 (Art Molecule, Poitiers, France) and CPA (Cyclopiazonic acid, Tocris) were prepared in DMSO. Stocks of PPADS (Tocris), TTX (Ascent Scientific, UK), D-AP5 (Ascent Scientific, UK), NBQX (Ascent Scientific, UK), MPEP (Ascent Scientific, UK), JNJ16259685 (Tocris), D,L-Fluorocitric acid barium salt (Sigma-Aldrich, France) were dissolved in water.

Statistics

Data were collected with the software Elphy (G. Sadoc, France). For analysis, sampling frequency was 2 kHz for recordings of spontaneous activity. Data analysis was performed off-line by using Clampfit (Axon Instruments) and Igor (WaveMetrics). Results are presented as mean ± S.E.M. and statistical significance was set at 0.05 using the Student's t-test or nonparametric (Mann–Whitney or Wilcoxon rank test) tests when samples were too small to verify the normal distribution. n indicates the number of cells included in the statistics.

Calcium imaging

Calcium imaging experiments were performed using the same patch clamp intracellular solution in which EGTA was substituted by the calcium sensitive dye Fluo-4 (100μM, Molecular Probes-Invitrogen, France). After at least 20 min from breaking-in, confined regions of Bergmann glia processes were illuminated at a single excitation wavelength (475±40nm). Excitation light coming from a 100W Xenon lamp was gated by an electromechanical shutter (T132 Uniblitz, Rochester, NY, USA). Calcium sensitive fluorescence changes were collected using a ×63 water-immersion objective, filtered by a barrier filter at 530±50 nm (dichroic mirror 500nm), recorded using a CCD camera (Coolsnap cf, Photometrics) and triggered by the Software Metavue (Molecular Probes). Individual images were recorded every 10 s with an exposure time of 75ms. It is important to notice that during the OGD protocol, the cerebellar tissue swelled rendering the analysis of calcium imaging experiments particularly difficult. The analysis was performed as previously reported (Habbas et al., 2011).

ISM recordings

The K⁺-sensitive microelectrodes were made according to the procedure used by Chever (Chever et al., 2010). Briefly, double-barreled electrodes were silyanized with dimethylchlorosilane, dried at 120°C for 2 h, and the tip of silyanized compartment was filled with the Potassium ionophore I-cocktail B (Sigma-Aldrich) and then with a solution of KCl at 0.2 M. The other barrel was filled with normal BBS solution for the recording of extracellular field potentials. Using an ionsensitive amplifier (ION-01M, NPI, Germany), we recorded both the potential at the reference barrel and at the K⁺-microelectrode and it was also possible to record the subtraction of these two signals in order to obtain the potential correlating exclusively with the [K⁺]_e. The microelectrode was calibrated in BBS solution at different KCl concentrations (4.15mM, 8mM, 20mM, 60mM, 200mM). Only K⁺-microelectrodes that provided stable recordings at every calibration solution change and that display voltage shifts of at least 54 mV for an increase in K⁺ concentration of 10mM were used (Voipio et al., 1996). In order to convert the voltage signal to [K⁺]_e, we used a the Nernst equation.

Results

Bergmann glia electrophysiological response to ischemia

In order to study Bergmann glia response to *in vitro* ischemia, acute cerebellar slices underwent oxygen and glucose deprivation (OGD) from the extracellular solution. Bergmann cells were patched-clamped in whole cell configuration and their membrane potential maintained at -70mV. During 30 min of OGD protocol, Bergmann glia developed a progressive inward current (I_{OGD}) that rapidly recovered to baseline in the post-OGD phase (fig. 1A, B). The maximal amplitude of I_{OGD} was variable within cells and it occurred at different moments during OGD protocol, therefore the Bergmann response to OGD was quantified by calculating the total electrical charge underlying I_{OGD} (see material and methods, mean value: 0.15±0.01 μC, n=19, fig.1B) and by the time to the first peak (9.4±0.5 min, n=23, fig. 1B).

Among the complex consequences of OGD, membrane potential depolarisation induces increases in neuronal firing with a consequent massive release of neurotransmitters. In order to check whether the activation of neurotransmitter receptors may be responsible for I_{OGD}, experiments were then performed in the presence of TTX (1μM) to prevent Na⁺-dependent action potential generation (Fig. 1A, B). No significant changes were observed in I_{OGD} charge (0.14±0.02 μC, n=8, P>0.1) or time to peak (9.2±1.0 min, n=7, P>0.5) indicating that neuronal firing in the cerebellar slice does not contribute to Bergmann response to OGD. For this reason, the experiments were pursued without TTX.

OGD induces intracellular calcium increases in Bergmann glia

Astrocytes are considered non-excitabile cells whose physiological functions and communication with other cells rely on increases in intracellular calcium. Bergmann cells are not an exception of the rule and exhibit spontaneous Ca^{2+} fluctuations both *in vitro* and *in vivo* (Hoogland and Kuhn, 2010). Therefore Ca^{2+} changes were studied during OGD in Bergmann glia.

Cytosolic calcium increased during OGD and gradually reached a maximal value ($\Delta\text{F}/\text{F}=130.9\pm 6.1\%$, $n=11$) that persisted throughout the entire duration of OGD (Fig. 2A). During the post-OGD phase, intracellular Ca^{2+} levels decreased to lower levels even though a complete recovery to the basal fluorescence was rarely observed ($\Delta\text{F}/\text{F}=53.9\pm 12.6\%$, $n=11$). Moreover, to better characterize Ca^{2+} dynamics, the time from the OGD onset and the peak of fluorescence was measured for each recorded cell (time to peak: 11.0 ± 0.8 minutes, $n=8$, Fig.2Ac). In order to investigate whether Ca^{2+} originates from intracellular Ca^{2+} stores, slices were incubated with CPA ($20\mu\text{M}$), a blocker of SERCA pumps responsible for calcium store refilling. CPA reduced the early phase (from 6 min to 14 min) of OGD-induced intracellular calcium rise to $22\pm 4\%$ of the control ($n=7$, $P<0.001$) leaving the late (from 22 min to 30 min) and persistent Ca^{2+} increase unaffected (to $87.6\pm 9.3\%$ of the control, $n=7$, $P>0.05$) (Fig. 2Aa and e). This effect was confirmed by a change in the latency of the maximal fluorescence variation that was also significantly delayed in CPA (Fig. 2A c and e) while the dynamics and the charge of I_{OGD} was unaffected (Fig. 2Ab, d and e). Activation of P2Y purinergic receptors can mobilize Ca^{2+} from internal stores in Bergmann glia processes (Beierlein and Regehr, 2006, Piet and Jahr, 2007). To determine whether these receptors were involved in Ca^{2+} increases during OGD, the effect of PPADS ($100\mu\text{M}$), a broad spectrum antagonist of purinergic receptors, was studied. Similarly to CPA, PPADS significantly increased the latency of the fluorescence peak ($P<0.0001$, Fig.2Ac). No Ca^{2+} increases were observed during the early phase of OGD ($\Delta\text{F}/\text{F} = -0.2\pm 3.1\%$ of the control, $n=7$, $P<0.001$) while the late Ca^{2+} increase was only marginally affected by the antagonist (to $88.8\pm 8.9\%$ of the control, $n=7$, $P>0.05$). These data suggest that in the early OGD phase, P2Y receptors are activated and trigger Ca^{2+} release from internal stores. Interestingly, this calcium increase does not seem to be correlated to membrane current in this early phase because neither CPA nor PPADS changed I_{OGD} onset (Fig.2Ab) or area (Fig 2Ad).

The effect of Ca^{2+} -free extracellular solution was next explored on OGD Ca^{2+} fluctuations (Fig. 2B). Application of a nominally Ca^{2+} free solution (supplemented with EGTA 5mM) reduced the basal fluorescence in Bergmann glia (by $38.5\pm 5.8\%$, $n=9$, not shown). When OGD protocol was performed, the overall Ca^{2+} response was strongly inhibited (Fig 2Ba and e). The early Ca^{2+} component originated with a latency comparable to control condition (Fig. 2Bc) but the mean fluorescence was only $32.5\pm 5.0\%$ of the baseline ($n=9$, against $78.8\pm 8.2\%$ in control, $P<0.0001$) suggesting that the presence of Ca^{2+} ions in the extracellular medium is fundamental for internal store refilling. Moreover the late Ca^{2+} component was dramatically reduced (to $12.4\pm 13.3\%$ of the control, $n=9$, $P< 0.001$, Fig.2B a and e) indicating that in late OGD period, Ca^{2+} enters Bergmann processes from the extracellular space. Again, Ca^{2+} ion

charge was not implicated in I_{OGD} because I_{OGD} dynamics and amplitude were not affected by depletion of extracellular Ca^{2+} (Fig. 2Bd).

Store-operated Ca^{2+} channels are normally activated in Bergmann glia following depletion of Ca^{2+} stores (Singaravelu et al., 2006). We tested the possibility that these Ca^{2+} channels were activated during OGD by using a blocker of store-operated Ca^{2+} channels, 2-APB (100 μM). Similarly to results obtained in Ca^{2+} -free condition the mean fluorescence value in the late phase was significantly reduced compared to control (to $25.1\pm 4.4\%$, $n=7$, $P<0.001$, Fig. 2Ba) and the early component was also reduced (to $26.5\pm 7.4\%$ of the control, $n=7$, $P<0.001$). These results indicate an involvement of store-operated Ca^{2+} entry during *in vitro* ischemia.

These results all together show that OGD induces a long-lasting intracellular Ca^{2+} increase in Bergmann glia that is mediated by both Ca^{2+} mobilisation from stores and Ca^{2+} entry from the extracellular space. Moreover Ca^{2+} ion charges are not involved in the generation of I_{OGD} opening the question of the identification of the neurotransmitters involved in this electric current.

Glutamate receptors and transporters are not playing a major role in Bergmann glia responses to OGD.

It has been shown that during ischemia, extracellular glutamate concentration increases dramatically in the cerebellum through both Ca^{2+} -dependent vesicular release (Hamann et al., 2005) and Ca^{2+} -independent mechanisms (Hamann et al., 2005; Beppu et al., 2014). As a consequence of this intense glutamate release, Purkinje neurons endure a severe anoxic depolarization through the activation of AMPA receptors (Hamann et al., 2005).

To test the possibility that glutamate release during cerebellar ischemia is also responsible for Bergmann cell responses, we performed double patch clamp recordings of Bergmann glia and Purkinje neurons during OGD protocol with or without antagonists of AMPA/kainate and NMDA receptors. As shown in Fig. 3A, the temporal evolution of Bergmann cell and Purkinje cell currents during OGD is substantially different: in the early OGD phase, Purkinje neuron holding current remained stable (or, in some cells, assumed outward values: $225\pm 54\text{pA}$, $n=10$) while in Bergmann cell, I_{OGD} gradually developed as an inward current. Then, Purkinje cells presented a rapid and huge inward current (mean peak current: $-5.7\pm 0.5\text{nA}$, $n=6$) that reflect the ‘anoxic depolarization’ previously reported by other teams (Hamann et al., 2005; Brady et al., 2010; Mohr et al., 2010). There was a delay of $16.9\pm 0.8\text{min}$ ($n=6$) from the start of OGD protocol and Purkinje cell peak current while for Bergmann glia the first I_{OGD} peak appeared significantly earlier ($9.0\pm 0.9\text{min}$, $n=6$, $P<0.0001$). In the post-OGD phase, the Purkinje cell current recovered only partly while Bergmann cell current completely returned to the baseline (fig.3A). When we performed paired recordings in the presence of NBQX (25 μM) and APV (50 μM), the OGD-induced inward current was almost totally abolished in Purkinje neurons but we were surprised to observe that Bergmann cell I_{OGD} was only slightly affected by these antagonists (Fig. 3A and 3B). These results were confirmed by single-cell patch clamp experiments in the presence of these blockers that

indicated a reduction to 78.6 ± 7.7 % of the control for Bergmann glia I_{OGD} ($n=13$, $P>0.05$; Fig. 3C) and to 1.3 ± 1.3 % of the control for Purkinje cell OGD-induced current ($n=5$, $P<0.0001$; Fig. 3C). Furthermore, Bergmann glia Ca^{2+} dynamics were not significantly affected by ionotropic glutamate receptor antagonists (first phase: 64.1 ± 15.5 % of the control, second phase: 117.4 ± 13.4 % of the control $P>0.05$, $n=4$, not shown).

Other inhibitors of the glutamatergic system were also tested on Bergmann glial cells (Fig. 4). The antagonists of type I metabotropic glutamatergic receptors, MPEP ($5\mu\text{M}$) and JNJ16259685 ($1\mu\text{M}$) did not significantly affect the OGD-induced current or time to the first peak (Fig. 4C) while the blocker of glutamate transporters, TBOA ($100\mu\text{M}$), significantly reduced the onset of I_{OGD} ($P<0.005$) leaving the mean amplitude unchanged (Fig. 4C, $P>0.5$).

All together, these experiments indicate that glutamate released during OGD totally account for the depolarizing current observed in Purkinje neurons but it has only minor effects on I_{OGD} and Ca^{2+} increases observed in Bergmann glia. This pharmacological result together with distinct I_{OGD} kinetics for Bergmann glia and Purkinje neurons, suggest that glia cells are not always merely following neuronal reactions.

Bergmann glia ionotropic P2X7 receptors are not activated during OGD.

It has been reported that during ischemia extracellular ATP concentration increases (Melani et al., 2005 ; Franke et al., 2006) leading to activation of both P2Y and P2X7 receptors in some brain areas (Domercq et al., 2010; Arbeola et al., 2012, but see also Leichsenring et al., 2013). Our Ca^{2+} imaging results indicate that Bergmann cell P2Y receptors are activated during OGD (Fig. 2A) suggesting that ATP can be released in the cerebellar cortex during ischemic conditions. We therefore explored the possibility that P2X7 receptors were also activated during OGD and could be involved in Bergmann depolarization. For this purpose, the effects of OGD were tested in Bergmann glia from P2X7 receptor-knockout mice. No differences were observed between WT and P2X7R^{-/-} mice ($I_{\text{OGD}}=0.14 \pm 0.02$ μC , $n=5$ in P2X7R^{-/-} mice, $P>0.1$ when compared to control, Mann-Whitney, Fig.5A and B), a result that was confirmed by using the selective P2X7 receptor antagonist A-740003 ($10\mu\text{M}$) in wild type mice ($I_{\text{OGD}}=0.16 \pm 0.01$ μC , $P>0.5$, $n= 6$; Fig.5B).

Extracellular K^+ concentration increases during cerebellar OGD

It has been well documented that, due to the abundance of K^+ channels, astrocyte membrane potential closely follows the $[\text{K}^+]_e$ variations (Walz, 2000). During cerebral ischemia, $[\text{K}^+]_e$ increases dramatically and astrocytes may play a key role in K^+ homeostasis through their K^+ transporters, ion channels and extensive gap junction coupling (Leis et al., 2005). Therefore it was fundamental to measure extracellular K^+ changes during cerebellar OGD through ion-sensitive electrodes placed in the molecular layer (Fig. 6A). With this technique, a gradual increase in $[\text{K}^+]_e$ was observed during OGD (maximal $[\text{K}^+]_e$ increase 4.5 ± 0.3 mM, $n=20$

slices, fig. 6A). In an attempt to correlate K^+ concentration changes and membrane potential in Bergmann glia, ion-sensitive electrode measurements were performed in parallel with Bergmann glia current-clamp recordings (Fig. 6B). During the first 10 min of OGD, Bergmann glia membrane depolarization and $[K^+]_e$ increase were tightly coupled showing a high degree of correlation (correlation coefficient $r^2 = 0.984 \pm 0.003$, $n=7$). However, after reaching a peak value, $[K^+]_e$ decreased slowly until a plateau value of 1.04 ± 0.34 mM above the baseline (at 30min OGD, $n=6$) while the membrane potential of the glial cell depolarized to a steady state value of -47.9 ± 4.8 mV (from a mean resting potential of -76.73 ± 1.16 mV, $n=7$) revealing that in the late OGD period, Bergmann membrane potential and $[K^+]_e$ variations are less correlated ($r^2 = 0.37 \pm 0.11$, $n=7$, $P < 0.05$ Wilcoxon signed-rank test, Fig. 6B) implying that another mechanism comes into play.

To confirm the activation of K^+ conductances during OGD, experiments were carried out in the presence of various K^+ channel blockers (Fig. 6C and D). Addition of barium (5mM) in the extracellular solution induced by itself an inward current in Bergmann glial cells (-1.83 ± 0.09 nA, $n=6$, not shown) and I_{OGD} was highly reduced (by $84.8 \pm 10.8\%$, $P < 0.001$, $n=6$, Fig. 6C and D). When TEA (10mM) was added to barium, I_{OGD} was completely abolished ($93.2 \pm 8.8\%$, $P < 0.001$, $n=8$, Fig. 6C and D). These data indicate that the increase in $[K^+]_e$ during OGD induces a progressive membrane depolarisation in Bergmann cells and that I_{OGD} is likely due to K^+ accumulation in the extracellular space suggesting a possible implication of Bergmann glia in K^+ ion buffering during cerebellar ischemia.

DIDS-sensitive anion channels are activated during OGD.

It has been recently shown that Bergmann glia undergo cytosolic acidification during OGD inducing the activation of anionic channels sensitive to 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS) (Sasaki et al., 2012; Beppu et al., 2014). These anionic channels have been proposed to be permeable to glutamate during cerebellar OGD but the effect of their activation on Bergmann glia has not been reported (Beppu et al., 2014). In order to investigate whether these channels are involved in Bergmann response to OGD, DIDS (1mM) was added to the extracellular solution. DIDS induced an inward current in all Bergmann cells tested (mean current value: 387 ± 60 pA, $n=7$, not shown) and significantly reduced I_{OGD} (to $43.7 \pm 14.2\%$ of the control, $n=5$, $P < 0.05$, Fig. 7A and B) without changing the time to the first peak (10.1 ± 0.8 min, $n=5$, $P > 0.5$ compared to the control condition, Fig. 7B). These results indicate that anion outflow through DIDS-sensitive channels is implicated in Bergmann glia I_{OGD} .

Discussion

In this study we extensively used the oxygen and glucose deprivation (OGD) protocol with the goal of mimicking cerebellar ischemia *in vitro*. The OGD protocol has indeed been shown to reproduce closely the principal effects of *in vivo* ischemic attacks (Rossi et al., 2000). We have characterised both the electrical and calcium responses of Bergmann glia in these pathological conditions. Our results show that during an OGD episode, Bergmann glial cells depolarize and display prolonged intracellular Ca^{2+} increases. These complex responses are generated by the temporal succession of multiple events including an increase in extracellular K^+ concentration, neurotransmitter release, Ca^{2+} mobilisation from internal stores and Ca^{2+} entry from the extracellular space.

The resting potential of astrocytes is typically more hyperpolarized with respect to neurons. The dominant permeability of their membranes to K^+ endow them with exquisite sensitivity to $[\text{K}^+]_e$ changes, and with the specific capability of buffering activity-dependent variations of this ion's concentration (MacAulay and Zeuthen, 2012). Bergmann cells are not an exception in this panorama. Consistently, extracellular K^+ buffering by these glial cells has been found to modulate Purkinje cell firing patterns (Wang et al., 2012).

K^+ accumulations in the extracellular space are hallmark events accompanying ischemia (Kraig et al. 1983). The loss of metabolic ATP associated with an ischemic event leads to progressive failure of ionic pumps, to the gradual loss of ionic gradients, and finally to K^+ outflow from cells and membrane depolarizations. Our experiments demonstrate that the increases of $[\text{K}^+]_e$ detected early during OGD are temporally correlated with Bergmann depolarizations. Their quantification (4.4mM on average) also allowed us to predict precisely equilibrium membrane potential changes using the Nernst equation (theoretical: 18.9mV, versus recorded: 22mV), further confirming that potassium homeostasis is a decisive factor in determining Bergmann glia electrical properties also during pathological conditions.

Consistently, we also found that application of the K^+ channel blockers Barium and TEA totally inhibits these depolarizing responses, although the elevated drug concentrations, which are truly effective at inhibiting passive conductances in Bergmann glia (Müller et al., 1994; Sasaki et al., 2012) do not allow us to identify the channel types involved. A role for several glial and/or neuronal K^+ conductances such as two-pore domain K^+ channels (Zhou et al., 2009; Benesova et al., 2012) or voltage-dependent K^+ channels (Gibor et al., 2004; Hibino et al., 2010) is thus possible. Moreover Ba^{2+} , at lower concentrations than those used here, can also inhibit inward rectifying Kir4.1 channels (Olsen et al., 2006, Tong et al., 2014), which are highly expressed in Bergmann glia (Higashi et al., 2001; Djukic et al., 2007).

Potassium ions accumulation in the extracellular space can explain Bergmann cell depolarisations only in early OGD (≈ 10 minutes). Later during energy deprivation, our data

indeed show that the membrane potential continues to depolarize while $[K^+]_e$ decreases, indicating that other mediators are implicated in the Bergmann cell electrical responses to ischemic events. None of the several distinct pharmacological blockers, which we examined, had a significant impact on the amplitude of I_{OGD} , with the exception of DIDS, a non-specific blocker of anionic conductances (see Tauskela et al., 2003 and Wurff, 2008). This finding is compatible with recent data from other groups showing that these channels are involved in glutamate release from Bergmann glia during OGD (Beppu et al., 2014). Our data are also in line with the hypothesis that an important contribution to membrane depolarizations derives from the outflow of negative charges from cells, namely either glutamate or other anions, through volume-regulated channels activated by the cellular swelling accompanying OGD (Brady et al., 2010; our personal observations).

Importantly, our study highlights major differences between the mechanisms mediating neuronal and glial responses to OGD in the cerebellar cortex.

In particular, glutamate release is the principal responsible for anoxic depolarizations of Purkinje neurons, whereas our data clearly indicate that it does not contribute to the currents and the Ca^{2+} transients developing in Bergmann glia during ischemia. This is a highly unexpected finding because Bergmann glia express Ca^{2+} -permeable AMPA receptors (Geiger et al., 1995) that are normally activated by glutamate originating from both parallel and climbing fibers in control conditions (Clark and Barbour, 1997; Matsui and Jahr, 2003). A possible explanation for this apparent contradiction may derive from the specific localizations of glia AMPA receptors at ectopic release sites (Matsui et al., 2005) where glutamate release follows different rules with respect to active zones (Matsui and Jahr, 2003, Bellamy and Ogden, 2005). Ectopic sites indeed seem to lack the fast vesicle recycling mechanisms that normally operate at synaptic sites (Balakrishnan et al., 2011), leading to strong synaptic depression of parallel fiber transmission during either high frequency or prolonged low frequency stimulation (Bellamy and Ogden, 2005). It is therefore possible that the global increase in neuronal excitability observed during OGD may similarly produce depression of ectopic glutamate release and reduce activation of glial AMPA receptors during OGD.

ATP is another neurotransmitter putatively involved in cerebral responses to ischemia. Previous studies have reported that ATP concentration increases in the extracellular space during an ischemic episode *in vivo* (Kharlamov et al. 2002; Franke et al., 2006) and that PPADS, a broad-spectrum antagonist of P2 receptors, significantly improves ischemic lesions in the cortex (Lammer et al., 2006). Our results suggest that ATP is released during OGD and that it activates purinergic P2Y receptors in Bergmann cells. In particular, we show that PPADS has specific delaying effects on the time course of Bergmann glia Ca^{2+} responses to OGD without affecting the depolarizing current amplitude associated with cellular depolarizations.

This effect is most likely due to the inhibition of P2Y metabotropic receptors by PPADS. P2Y

receptors indeed are high affinity ATP sensors that can mobilize Ca^{2+} from internal stores (Beierlein and Regehr, 2006; Piet and Jahr, 2007). In contrast, we have no evidence in favour of the activation of ionotropic P2X7 receptors (Habbas et al., 2011), which have a very low affinity for ATP (North, 2002; Young et al., 2007; Habbas et al., 2011) and whose role in brain ischemia is still debated following contrasting data obtained in the hippocampus and the neocortex (Arbeloa et al., 2012; Leichsenring et al., 2013). It will nonetheless be interesting to further examine this issue in the future, for example in conditions where the activity of endogenous ecto-nucleotidases is antagonized. These enzymes are responsible for the rapid degradation of ATP both in normal conditions (Kukley et al., 2004), and during ischemia (Melani et al., 2012) explaining, at least in part, the poor activation of P2X7 receptors in these pathological conditions.

Simultaneous patch-clamp recordings revealed precious temporal information about the time course of the responses to OGD of Bergmann glia and Purkinje neurons, further revealing important differences between these two cells, as follows: 1) Bergmann glia membranes depolarize gradually a few minutes following OGD onset, as a consequence of the increase in $[\text{K}^+]_e$. No depolarizing currents are observed in Purkinje neurons in this early phase, although the increase in the frequency of spontaneous postsynaptic currents recorded in this early period in Purkinje neurons (from 2.8 ± 0.3 Hz to 6.1 ± 0.7 Hz, $n=7$, not shown) clearly demonstrates that network excitability is already enhanced at this stage. 2) Large inward currents develop in Purkinje neurons only late after OGD onset (≈ 15 minutes), reflecting the accumulation of extracellular glutamate, whereas, as mentioned previously, neighbouring Bergmann glia are poorly affected by this neurotoxic transmitter. 3) Finally, in the post-OGD phase, judging by electrophysiological criteria, Bergmann glia cells recover completely while Purkinje neurons display only either a partial, or no recovery.

Can we conclude that for these reasons Bergmann glial cells are more resistant than Purkinje neurons to ischemia? And is the overall role of Bergmann glial cells detrimental or protective for neuronal function? In the cerebellum glutamate release from Bergmann glia has been found to be closely associated with intracellular acidifications during OGD, indicating that these cells are implicated in neurotoxicity (Beppu et al., 2014). Here we could not unambiguously identify a role for Bergmann glia in generating the excitatory drive that kills Purkinje cells during OGD but we found that Bergmann glia participate to K^+ uptake from the extracellular space. This function may indicate a non-detrimental role of these glial cells in the early OGD.

We think that a detailed understanding of the astrocytic response to ischemia is necessary to develop effective treatment strategies for stroke patients.

References

- ✓ Arbeloa J, Pérez-Samartín A, Gottlieb M, Matute C (2012) P2X7 receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in neurons and reduces brain damage after ischemia. *Neurobiol Dis.* 45: 954-61.
- ✓ Balakrishnan S, Jackson C, Russell N, Bellamy TC (2011) Ectopic release sites lack fast vesicle recycling mechanisms, causing long-term depression of neuron-glia transmission in rat cerebellum. *Glia* 59: 82-93.
- ✓ Bellamy TC, Ogden D (2005) Short-term plasticity of Bergmann glial cell extrasynaptic currents during parallel fibre stimulation in rat cerebellum. *Glia.* 52: 325–35.
- ✓ Benesova J, Rusnakova V, Honsa P, Pivonkova H, Dzamba D, Kubista M, Anderova M.(2012) Distinct expression/function of potassium and chloride channels contributes to the diverse volume regulation in cortical astrocytes of GFAP/EGFP mice. *PLoS One.* 7: e29725.
- ✓ Beppu K, Sasaki T, Tanaka KF, Yamanaka A, Fukazawa Y, Shigemoto R, Matsui K. (2014) Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage. *Neuron.* 81: 314-20.
- ✓ Bergles DE, Dzuby JA, Jahr CE (1997) Glutamate transporter currents in bergmann glial cells follow the time course of extrasynaptic glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 14821-5.
- ✓ Brady JD, Mohr C, Rossi DJ (2010) Vesicular GABA release delays the onset of the Purkinje cell terminal depolarization without affecting tissue swelling in cerebellar slices during simulated ischemia. *Neuroscience.* 168: 108-17.
- ✓ Castejón OJ, Dailey ME, Apkarian RP, Castejón HV (2002) Correlative microscopy of cerebellar Bergmann glial cells. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 34: 131-42
- ✓ Chever O, Djukic B, McCarthy KD, Amzica F. (2010) Implication of Kir4.1 channel in excess potassium clearance: an in vivo study on anesthetized glial-conditional Kir4.1 knock-out mice. *J Neurosci.* 30(47): 15769-77.
- ✓ Clark BA, Barbour B (1997) Currents evoked in Bergmann glial cells by parallel fibre stimulation in rat cerebellar slices. *J Physiol.* 502: 335-50.
- ✓ Djukic B, Casper KB, Philpot BD, Chin LS, McCarthy KD. (2007) Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation. *J Neurosci.* 27:11354-65.
- ✓ Domercq M, Perez-Samartin A, Aparicio D, Alberdi E, Pampliega O, Matute C. (2010) P2X7 receptors mediate ischemic damage to oligodendrocytes. *Glia.* 58: 730-40.

- ✓ Franke H, Grummich B, Härtig W, Grosche J, Regenthal R, Edwards RH, Illes P, Krügel U (2006) Changes in purinergic signaling after cerebral injury -- involvement of glutamatergic mechanisms? *Int J Dev Neurosci.* 24:123-32
- ✓ Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P and Monyer H (1995) *Neuron.* 15(1):193-204.
- ✓ Gibor G, Yakubovich D, Peretz A, Attali B (2004) External barium affects the gating of KCNQ1 potassium channels and produces a pore block via two discrete sites. *J Gen Physiol.* 124(1): 83-102.
- ✓ Gibson CL, Coughlan TC, Murphy SP (2005) Glial nitric oxide and ischemia. *Glia* 50:417-26.
- ✓ Habbas S, Ango F, Daniel H, Galante M. (2011) Purinergic signaling in the cerebellum: Bergmann glial cells express functional ionotropic P2X7 receptors. *Glia.* 59: 1800-12.
- ✓ Hamann M, Rossi DJ, Mohr C, Andrade AL, Attwell D. (2005) The electrical response of cerebellar Purkinje neurons to simulated ischaemia. *Brain.* 2005 128:2408-20.
- ✓ Hansen AJ. (1985) Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev* 65(1):101-48.
- ✓ Hassel B, Paulsen RE, Johnsen A, Fonnum F (1992) Selective inhibition of glial cell metabolism in vivo by fluorocitrate. *Brain Res.* 576:120-4.
- ✓ Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev.* 90(1): 291-366.
- ✓ Hirrlinger PG, Wurm A, Hirrlinger J, Bringmann A, Reichenbach A (2008) Osmotic swelling characteristics of glial cells in the murine hippocampus, cerebellum, and retina in situ. *J Neurochem.* 105: 1405-17.
- ✓ Higashi K, Fujita A, Inanobe A, Tanemoto M, Doi K, Kubo T, Kurachi Y (2001) An inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 281(3):C922-31.
- ✓ Hoogland TM, Kuhn B (2010) Recent developments in the understanding of astrocyte function in the cerebellum in vivo. *Cerebellum.* 9:264-71.
- ✓ Kharlamov Jones SC, Kim DK (2002) Suramin reduces infarct volume in a model of focal brain ischemia in rats. *Exp Brain Res* 147:353-9.
- ✓ Kimelberg HK (2005) Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy. *Glia.* 50: 389-97.
- ✓ Kraig RP, Ferreira-Filho CR, Nicholson C. (1983) Alkaline and acid transients in cerebellar microenvironment. *J Neurophysiol.* 49: 831-50.
- ✓ Kukley M, Stausberg P, Adelmann G, Chessell IP, Dietrich D. (2004). Ecto-nucleotidases and nucleoside transporters mediate activation of adenosine receptors on

- hippocampal mossy fibers by P2X7 receptor agonist 20-30-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP. *J Neurosci* 24:7128-7139.
- ✓ Lämmer A, Günther A, Beck A, Krügel U, Kittner H, Schneider D, Illes P, Franke H. (2006) Neuroprotective effects of the P2 receptor antagonist PPADS on focal cerebral ischaemia-induced injury in rats. *Eur J Neurosci*. 23(10):2824-8.
 - ✓ Leichsenring A, Riedel T, Qin Y, Rubini P, Illes P. (2013) Anoxic depolarization of hippocampal astrocytes: possible modulation by P2X7 receptors. *Neurochem Int*. 62: 15-22.
 - ✓ Leis JA, Bekar LK, Walz W. (2005) Potassium homeostasis in the ischemic brain. *Glia*. 50: 407-16.
 - ✓ Liang D, Bhatta S, Gerzanich V, Simard JM (2007) Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. *Neurosurg Focus* 22(5): E2.
 - ✓ MacAulay N, Zeuthen T (2012) Glial K⁺ clearance and cell swelling: key roles for cotransporters and pumps. *Neurochem Res*. 37(11): 2299-309.
 - ✓ Matsui K, Jahr CE (2003) Ectopic release of synaptic vesicles. *Neuron* 40(6): 1173-83.
 - ✓ Melani A, Turchi D, Vannucchi MG, Cipriani S, Gianfriddo M, Pedata F. (2005) ATP extracellular concentrations are increased in the rat striatum during in vivo ischemia. *Neurochem Int*. 47: 442-8.
 - ✓ Melani A, Corti F, Stephan H, Müller CE, Donati C, Bruni P, Vannucchi MG, Pedata F (2012) Ecto-ATPase inhibition: ATP and adenosine release under physiological and ischemic in vivo conditions in the rat striatum. *Exp Neurol*. 233(1): 193-204.
 - ✓ Mohr C, Brady JD, Rossi DJ (2010) Young age and low temperature, but not female gender delay ATP loss and glutamate release, and protect Purkinje cells during simulated ischemia in cerebellar slices. *Neuropharmacology* 58: 392-403.
 - ✓ Müller T, Fritschy JM, Grosche J, Pratt GD, Möhler H, Kettenmann H (1994) Developmental regulation of voltage-gated K⁺ channel and GABAA receptor expression in Bergmann glial cells. *J Neurosci* 14: 2503-14.
 - ✓ Nedergaard M, Dirnagl U (2005) Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia*. 50: 281-6.
 - ✓ North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82: 1013–67.
 - ✓ Olsen ML, Higashimori H, Campbell SL, Hablitz JJ, Sontheimer H (2006) Functional expression of Kir4.1 channels in spinal cord astrocytes. *Glia*. 53(5):516-28.
 - ✓ Olsen ML, Sontheimer H (2008) Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: from K⁺ buffering to cell differentiation. *J Neurochem*. 107(3): 589-601.
 - ✓ Pekny M, Nilsson M (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50: 427-34.
 - ✓ Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403:316-21.
 - ✓ Rossi DJ, Brady JD, Mohr C (2007) Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci*. 10: 1377-86.

- ✓ Sasaki T, Beppu K, Tanaka KF, Fukazawa Y, Shigemoto R, Matsui K (2012) Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109: 20720-5.
- ✓ Shao, Y. and K. D. McCarthy (1997). "Responses of Bergmann glia and granule neurons in situ to N-methyl-D-aspartate, norepinephrine, and high potassium." *J Neurochem* 68(6): 2405-11.
- ✓ Silver J, Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5: 146-56.
- ✓ Singaravelu K, Lohr C, Deitmer JW (2006) Regulation of store-operated calcium entry by calcium-independent phospholipase A2 in rat cerebellar astrocytes. *J Neurosci.* 26(37): 9579-92.
- ✓ Takayasu Y, Iino M, Kakegawa W, Maeno H, Watase K, Wada K, Yanagihara D, Miyazaki T, Komine O, Watanabe M, Tanaka K, Ozawa S (2005) Differential roles of glial and neuronal glutamate transporters in Purkinje cell synapses. *J Neurosci.* 25: 8788-93.
- ✓ Tauskela JS, Mealing G, Comas T et al (2003) Protection of cortical neurons against oxygen-glucose deprivation and N-methyl-D-aspartate by DIDS and SITS. *Eur J Pharmacol* 464:17–25.
- ✓ Tong X, Ao Y, Faas GC, Nwaobi SE, Xu J, Hausteiner MD, Anderson MA, Mody I, Olsen ML, Sofroniew MV, Khakh BS (2014) Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice. *Nat Neurosci.* 17(5): 694-703.
- ✓ Voipio, J., M. Pasternack and K. Macleod (1996) Ion-sensitive microelectrodes, Chapter 11 in Ogden, D «Microelectrode Techniques - The Plymouth Workshop Handbook », Second Edition, The Company of Biologists Ltd., Cambridge.
- ✓ Walz W. (2000) Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int.* 36(4-5):291-300.
- ✓ Wang F, Xu Q, Wang W, Takano T, Nedergaard M. (2012) Bergmann glia modulate cerebellar Purkinje cell bistability via Ca²⁺-dependent K⁺ uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;109(20):7911-6.
- ✓ Xu-Friedman MA, Harris KM, Regehr WG (2001) Three-dimensional comparison of ultrastructural characteristics at depressing and facilitating synapses onto cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci.* 21: 6666-72.
- ✓ Young MT, Pelegrin P, Surprenant A. 2007. Amino acid residues in the P2X7 receptor that mediate differential sensitivity to ATP and Bz-ATP. *Mol Pharmacol* 71:92–100.
- ✓ Zhou M, Xu G, Xie M, Zhang X, Schools GP, Ma L, Kimelberg HK, Chen H (2009) TWIK-1 and TREK-1 are potassium channels contributing significantly to astrocyte passive conductance in rat hippocampal slices. *J Neurosci* 29: 8551–8564.

Figures

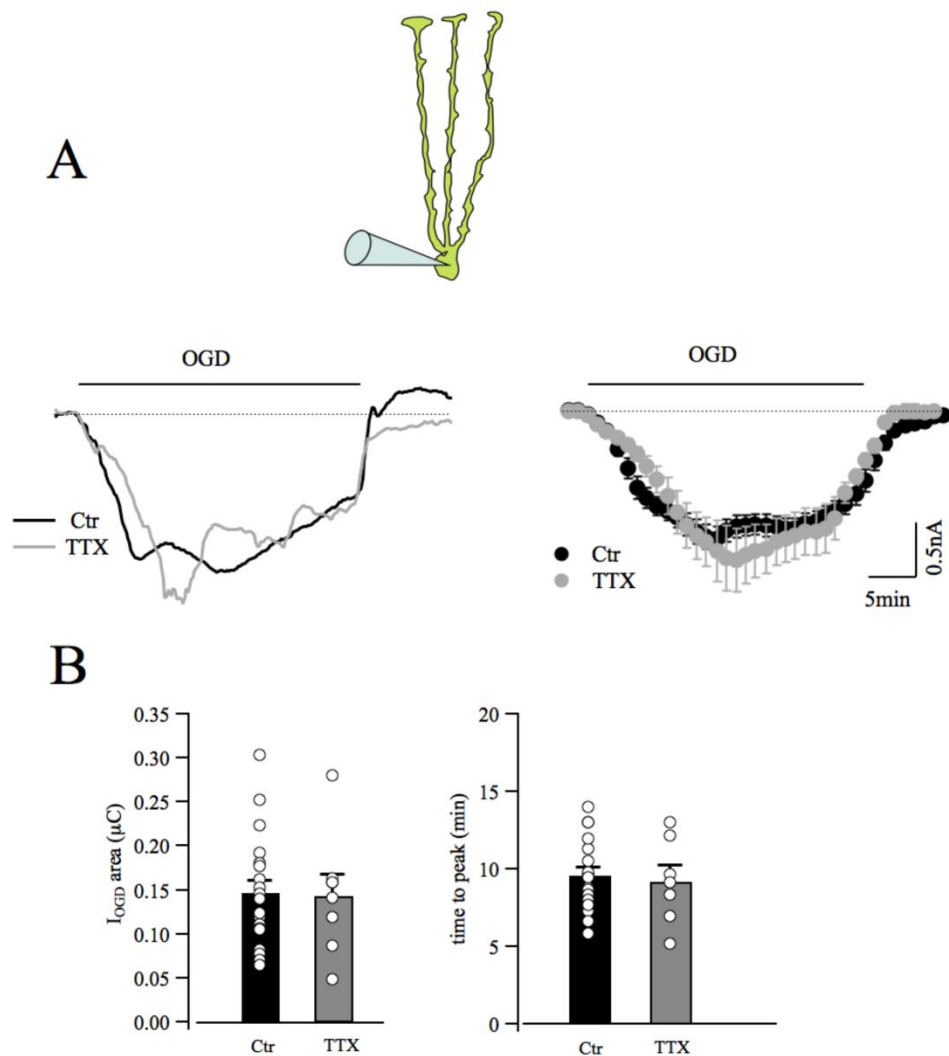


Figure 1. OGD induces depolarizing currents that are independent from action potential.

A: Whole-cell patch clamp recordings of two Bergmann glial cells during 30min of OGD in control or in the presence of TTX (1 μM). Mean traces from several Bergmann cells (right) recorded in control (n=19) and TTX (n=8), each point represents the average membrane current binned into 10 s periods. **B:** The electrical charge underlying I_{OGD} (Ctr, n=19 and TTX, n=8; left) and the time to the first current peak (Ctr, n=23 and TTX, n=7; right) are calculated for each recorded cells: there is no statistical difference between the two cell populations.

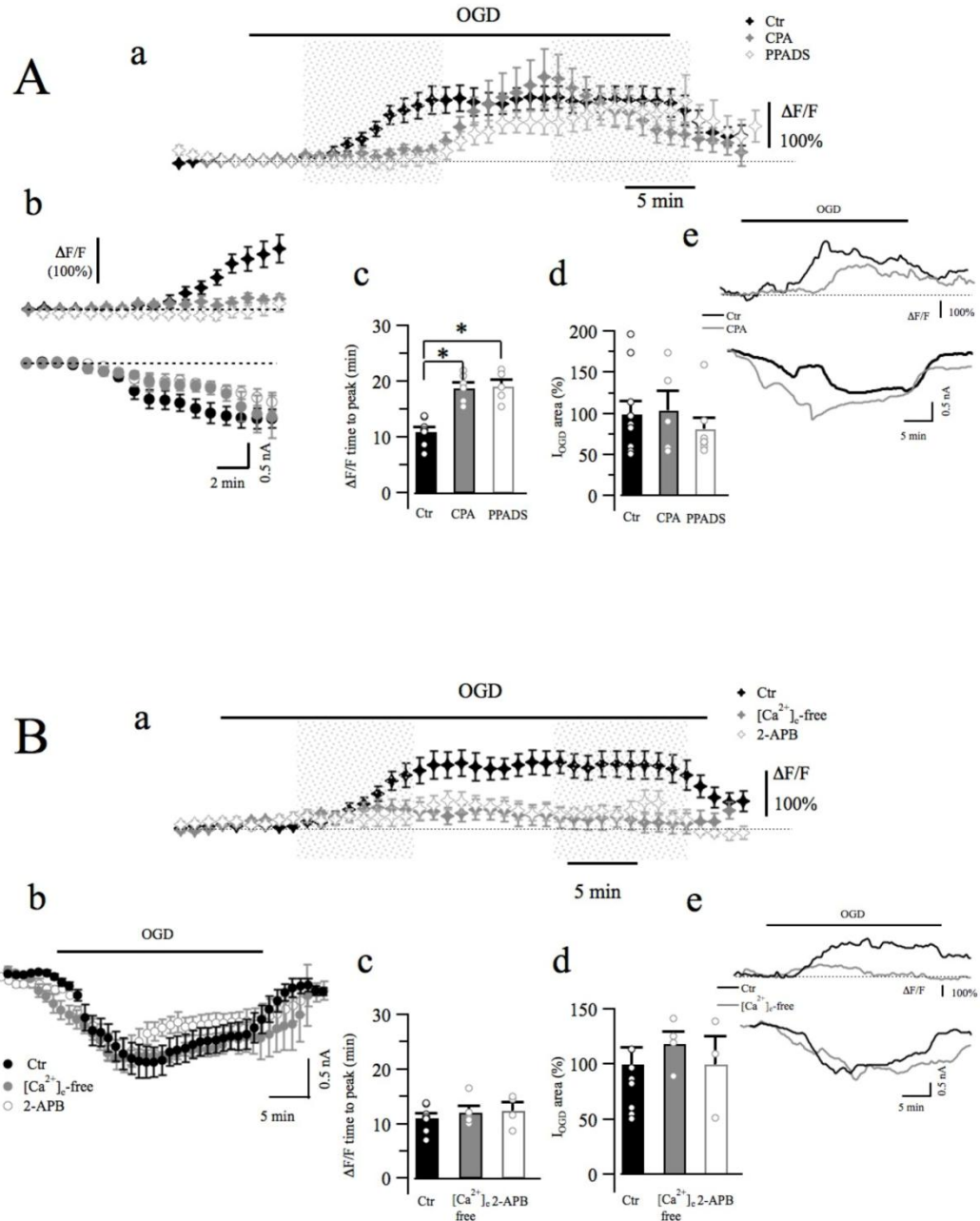


Figure 2. Sustained intracellular Ca^{2+} increases are observed in Bergmann glia during OGD.

A: Bergmann glial cells are loaded with Fluo4 (100 μ M) and changes in fluorescence are measured during OGD. Averaged $\Delta F/F$ values are plotted as a function of time in Ctr (n=11), after treatment with CPA (20 μ M), a blocker of intracellular Ca^{2+} stores refilling (n=7) or with PPADS (100 μ M), a broad-spectrum inhibitor of P2 receptors (n=8). CPA and PPADS significantly delayed the onset of intracellular Ca^{2+} increase without affecting the OGD current dynamics (**b**) or the electrical charge (**d**). (**e**) Examples of cytosolic Ca^{2+} changes and membrane currents induced in a Bergmann cell in control or following CPA incubation.

B: Extracellular Ca^{2+} -free solution (+EGTA 5mM, n=9) or 2-APB (100 μM , n=7), a blocker of store operated Ca^{2+} entry, dramatically reduces OGD-induced Ca^{2+} transients (**a**) without significantly affecting the OGD current (**b**), the time to the fluorescence peak (**c**) or the electrical charge (**d**). (**e**) Single traces are shown for an experiment in Ctr or in the absence of extracellular Ca^{2+} .

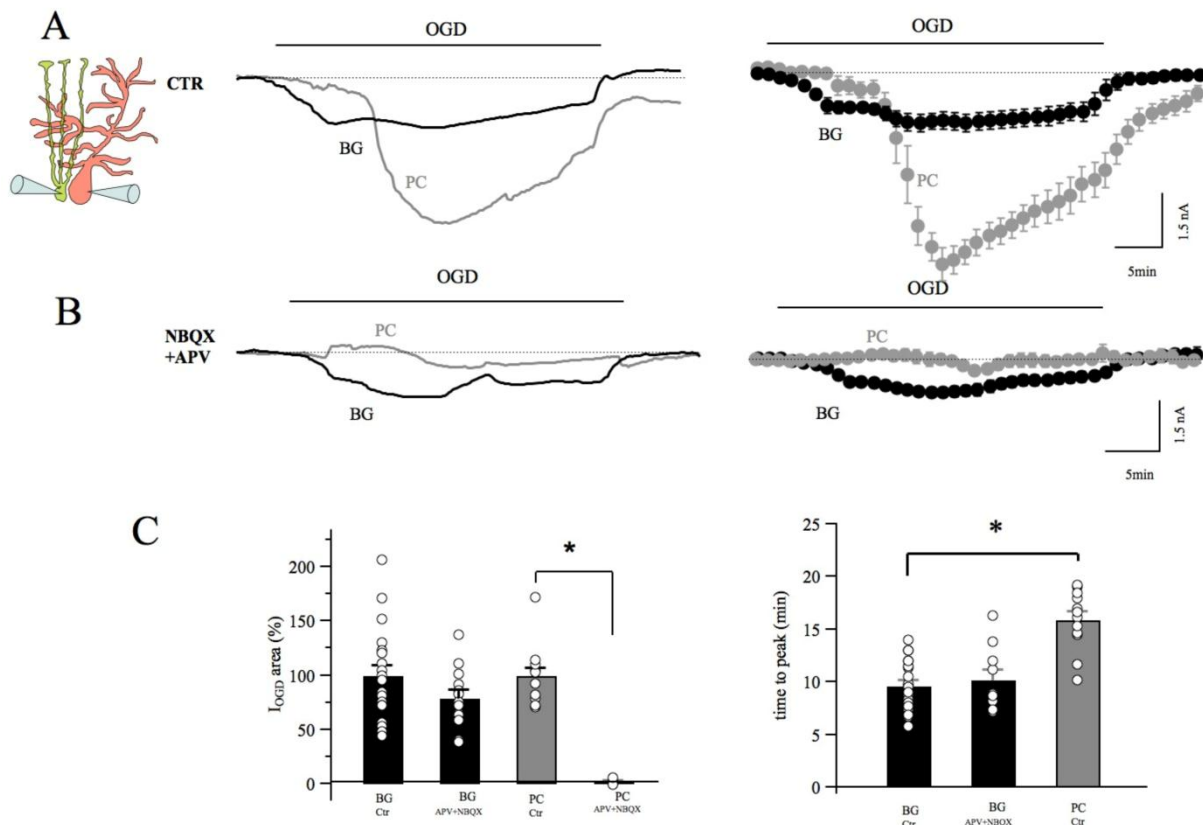


Figure 3. Glutamate differentially affects Purkinje neurons and Bergmann glia.

A: Double patch clamp recordings of a Bergmann glial cell and a Purkinje neuron during OGD. Mean traces are shown at the right (n=6). Note the difference in current dynamic, amplitude and post-OGD phase in the two cell types. **B:** NBQX (25 μM) and APV (50 μM) drastically suppress OGD-induced currents in Purkinje neurons while no effect is observed in I_{OGD} of Bergmann cells (n=5). **C:** left: Quantification of the electrical charge calculated in OGD experiments or in the presence of ionotropic glutamate receptor blockers in Bergmann glial cells (n=19 and n=13 respectively) and Purkinje neurons (n=10 and n=4 respectively). Note the lack of effect of APV+NBQX on Bergmann I_{OGD} . Right: The current time to peak is significantly delayed in Purkinje neurons (n=19) when compared to Bergmann glia (n=12), and APV+NBQX has no significant effects (n=10 Bergmann cells, n=5 Purkinje cells).

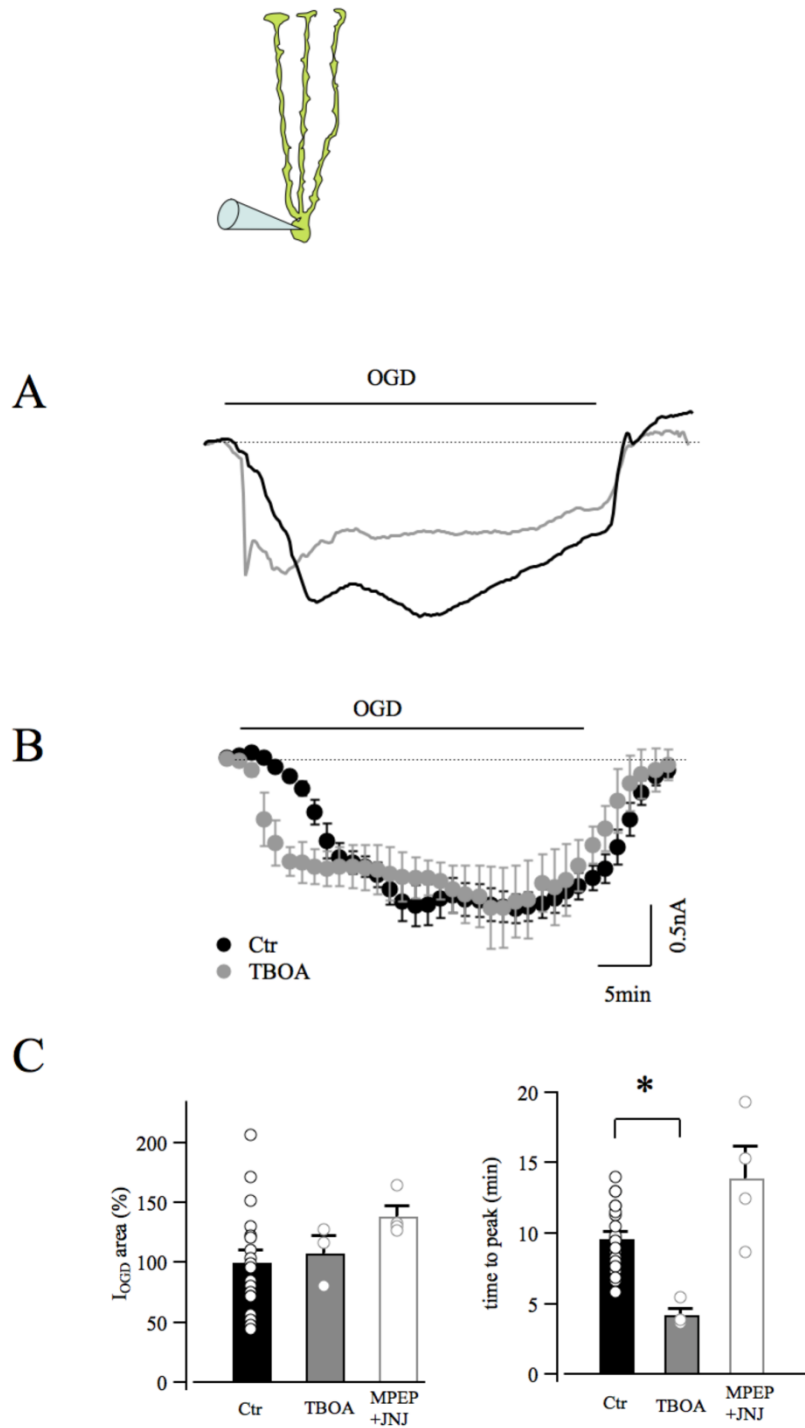


Figure 4. Inhibition of glutamate transporters accelerates OGD kinetics in Bergmann glia.

A: Examples of Bergmann glia currents in control and in the presence of TBOA (100 μ M), an inhibitor of glutamate transporters. **B:** Mean traces in control (n=19) and in presence of TBOA (n=4). **C:** Neither TBOA nor group I metabotropic glutamate receptor blockers (MPEP 5 μ M + JNJ16259685 1 μ M, n=4) significantly affect the OGD-induced current charge (left) while, TBOA significantly decreases the time to peak of OGD-induced currents (n=23 in Ctr, n=3 in TBOA, n=4 in MPEP + JNJ16259685).

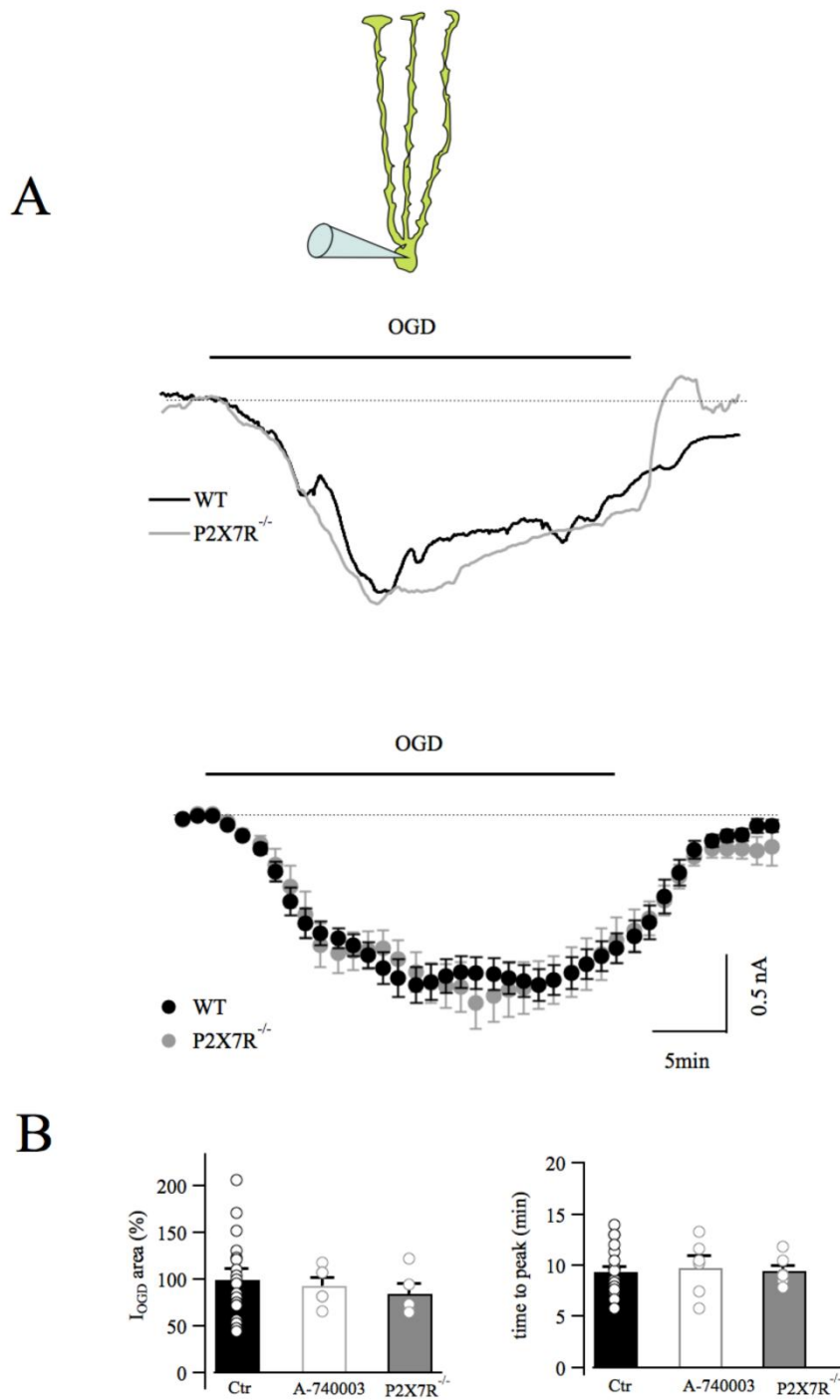


Figure 5. P2X7R activation is not observed during OGD.

A: Representative currents from a Bergmann glial cell in wild type and P2X7R^{-/-} mice. Mean currents are shown at the bottom (n=19 and n=8 from wild type and P2X7R^{-/-} mice respectively). **B:** No statistical differences are observed in the electrical charge or in the time to peak of I_{OGD} among WT, P2X7R^{-/-} mice and cells from wild-type mice treated with the P2X7R antagonist, A-740003 (10 μ M). For I_{OGD} charge: n=19 in WT, n=6 in A-740003 and n=5 in P2X7R^{-/-}; for time to peak: n=23 in WT, n=6 in A-740003 and n=7 in P2X7R^{-/-}.

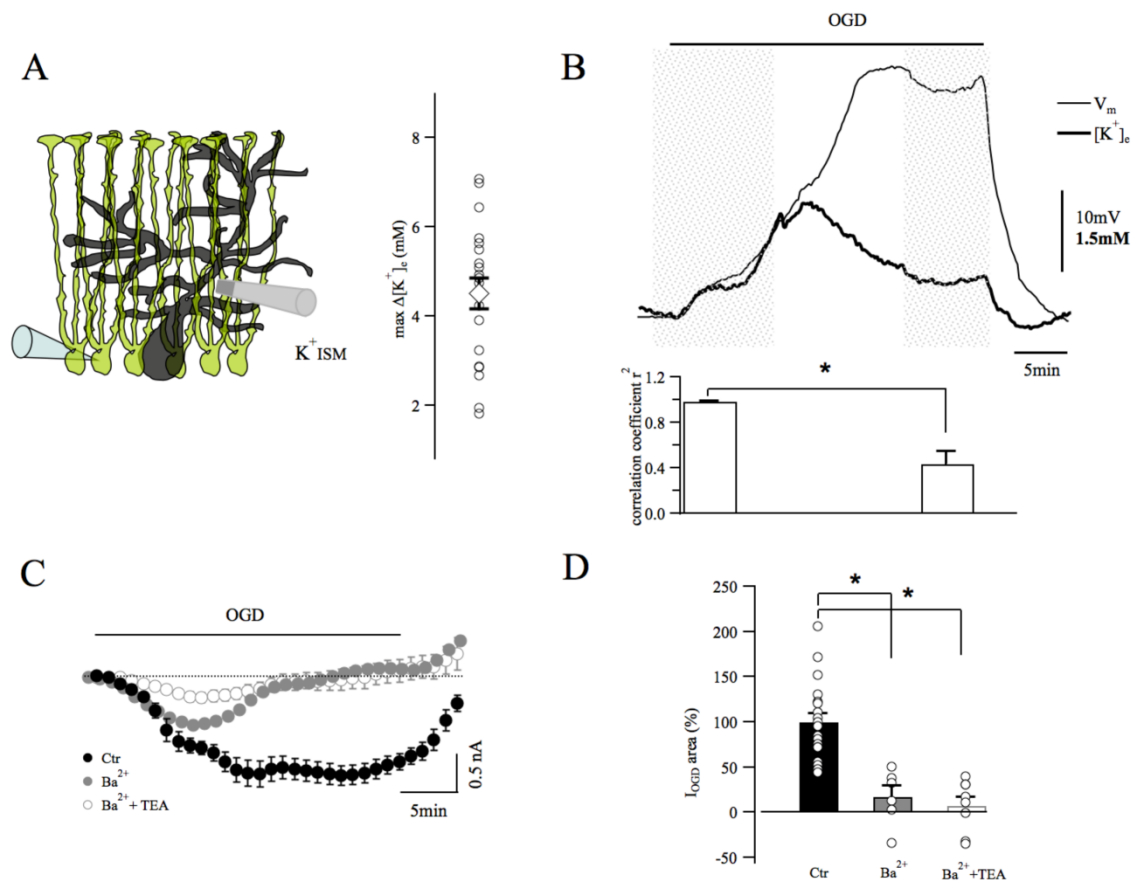


Figure 6. Extracellular K⁺ accumulation during OGD partially account for Bergmann cell depolarization.

A: Extracellular K⁺ concentration is measured through an ion-sensitive microelectrode placed in the molecular layer. Maximal values of [K⁺]_e variations recorded during OGD are reported in the plot (n=22). **B:** An example of simultaneous recordings of [K⁺]_e changes and Bergmann glia membrane potential during OGD. During the first 10 min of OGD protocol, the membrane potential and [K⁺]_e increase concomitantly revealing high degree of correlation (n=7) while after this time [K⁺]_e decreases and membrane depolarization increases further. **C:** Mean currents recorded in control (n=19), in the presence of Ba²⁺ (5mM, n=6) or Ba²⁺+ TEA (10mM, n=8). These K⁺ channel inhibitors significantly reduce the electrical charge of Bergmann glia I_{OGD} (**D**).

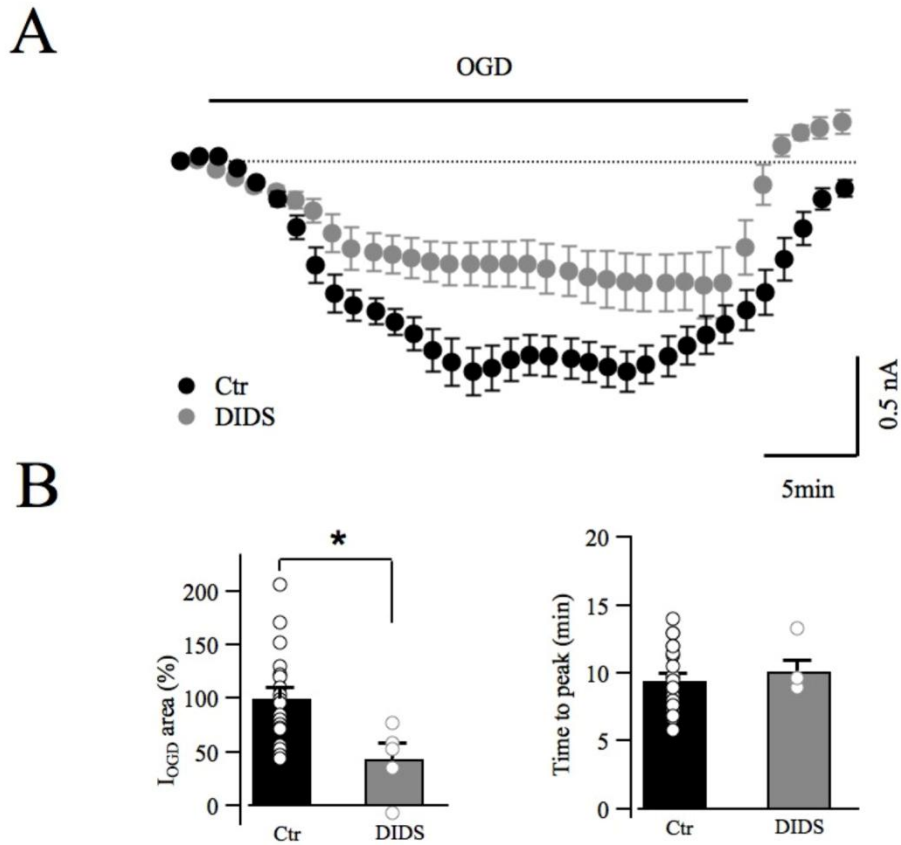


Figure 7. DIDS partially blocks OGD-induced currents in Bergmann glia.

A: Average currents recorded during OGD with (n=7) or without (n=19) a non-specific blocker of anion channels DIDS (1mM). **B:** Average changes of OGD-induced current and time to the first peak current in control (n=19) and in the presence of DIDS (n=5).

4. Expériences à température ambiante

a. Effet sur le courant induit par l'OGD

Comme je l'ai expliqué en introduction de ce chapitre résultats, le point de départ de mon projet de thèse était centré sur une implication possible des récepteurs P2X7 dans la réponse à l'OGD. Nos résultats montrent que l'ATP est effectivement libéré pendant l'OGD et permet l'activation des récepteurs P2Y des cellules de Bergmann. Cette activation entraîne la libération de Ca^{2+} dans le cytosol via les réserves du réticulum endoplasmique (voir article). En revanche, cet ATP externe ne semble pas suffisant pour activer les récepteurs P2X7. Etant donné que l'ATP extracellulaire est dégradé par de multiples enzymes, telles que les ecto-5'-nucléotidases ou les NTPDases, on a voulu voir si en baissant la température du milieu externe, nous pouvions ralentir l'activité de ces enzymes et éventuellement démasquer l'activation des récepteurs P2X7.

La figure 35 compare I_{OGD} à température ambiante et à température plus physiologique. Dans les deux cas l'OGD induit un courant entrant de forte amplitude (supérieur à 1 nA), mais le déroulement temporel de ces courants est bien différent. En effet, le courant I_{OGD} à température ambiante est plus lent et progressif que celui enregistré à température plus physiologique (Figure 35A et 35B). Par contre, la température ne semble pas affecter la phase post-OGD : le courant revient rapidement à la ligne de base, sans différence de cinétique évidente (Figure 35B). Pour comparer les cinétiques de l' I_{OGD} dans les deux populations de cellules on détermine le temps entre le début de l'OGD et le premier pic du courant. On trouve alors un temps qui est presque trois fois plus important à température ambiante ($T_{31-33^{\circ}\text{C}}=9.4\pm 0.5$ min, $n=23$ vs $T_{21-23^{\circ}\text{C}}=26.9\pm 0.9$ min, $n=13$, $P<0.001$, Figure 35C), confirmant quantitativement le retard observé sur les tracés moyens. De même, la charge électrique globale du courant induit par l'OGD est réduite en condition de température ambiante par rapport aux expériences à température plus élevée ($I_{\text{OGD } 31-33^{\circ}\text{C}}= 0.15\pm 0.01$ μC , $n=19$ vs $I_{\text{OGD } 21-23^{\circ}\text{C}}= 0.1\pm 0.01$ μC , $P<0.05$, Figure 35D). Ces données montrent que la température joue un rôle majeur dans la réponse électrophysiologique de la cellule de Bergmann à l'OGD.

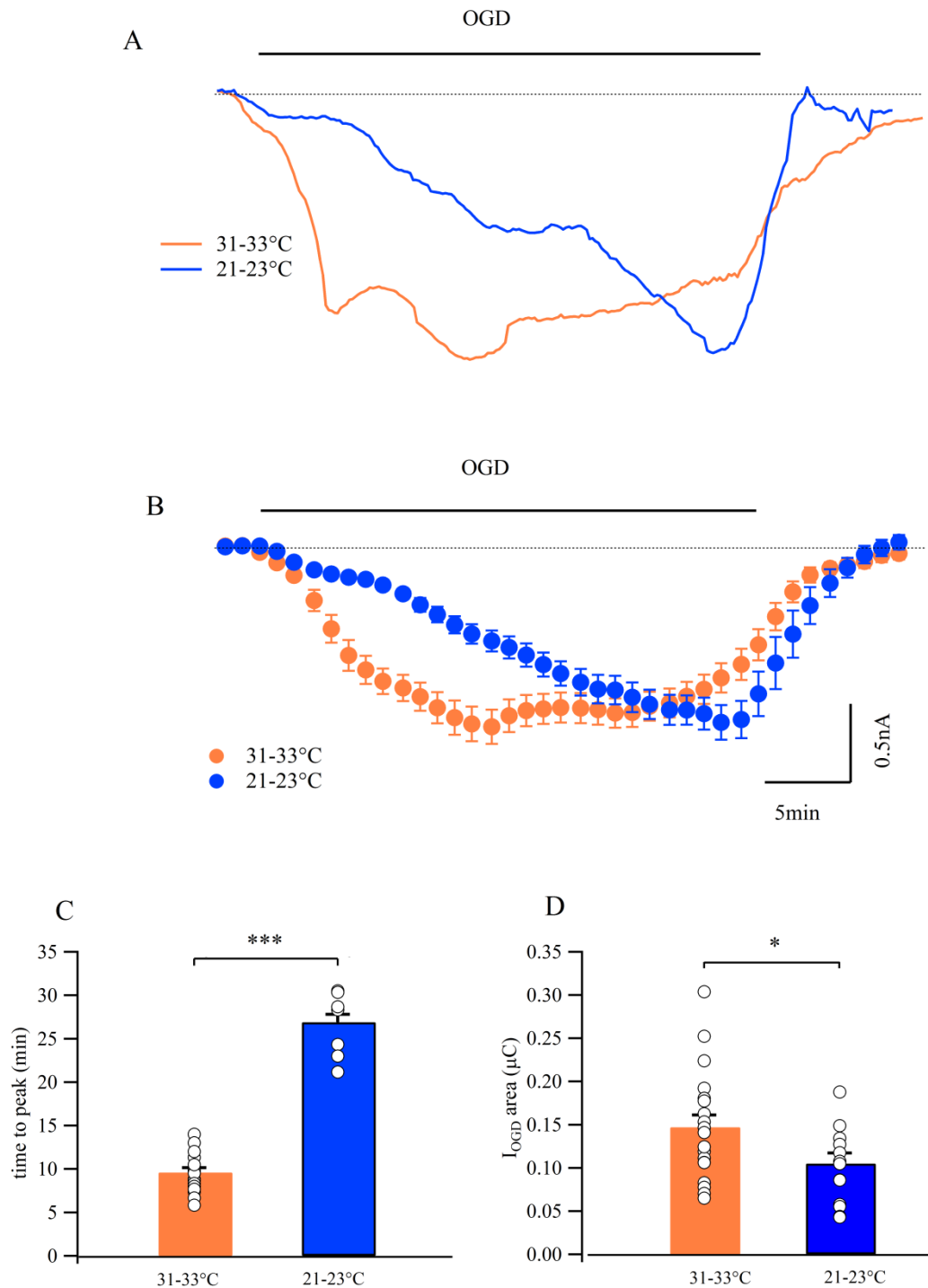


Figure 35 : La réponse à l'OGD est retardée lorsque la température est diminuée

- A. Réponse caractéristique de deux cellules de Bergmann enregistrées soit à une température de 31-33°C (orange), soit à 21-23°C (bleu).
- B. Réponses électrophysiologiques moyennes des cellules de Bergmann à température élevée (31-33°C en orange, n=19) ou à température ambiante (21-23°C en bleu, n=13).
- C. La dynamique de réponse à l'OGD est significativement retardée dans des conditions de température ambiante ($P < 0.001$).
- D. La charge électrique sous-tendant I_{ODG} calculée pour chaque cellule de Bergmann enregistrée à t_{31-33} (n=19) et à t_{21-23} (n=13), est significativement réduite à température ambiante ($p < 0.05$).

a. Effet sur la montée calcique induite par l'OGD

Nous avons donc voulu savoir si la montée calcique qui accompagne l'OGD était aussi affectée par la réduction de la température. La figure 36 montre les variations moyennes de calcium cytosolique dans les cellules de Bergmann au cours de l'OGD, dans les deux conditions de température. On constate que, comme pour le courant induit par l'OGD, la dynamique de la montée calcique est fortement retardée lorsque l'expérience se déroule à température ambiante (Figure 36). En effet, après 6 minutes d'OGD et durant 12 minutes, les augmentations relatives de fluorescence sont significativement plus importantes à 31-33°C par rapport à l'augmentation observée à température ambiante ($\Delta F/F_{31-33^\circ\text{C}}=107.9\pm 8.4\%$; $\Delta F/F_{21-23^\circ\text{C}}=16.98\pm 4.43\%$, $P<0.001$). En revanche à partir de 22 min d'OGD, le signal calcique est similaire dans les deux conditions ($\Delta F/F_{31-33^\circ\text{C}}=131.3\pm 8.32\%$; $\Delta F/F_{21-23^\circ\text{C}}=141.22\pm 12.39\%$, $P>0.5$). Il s'agit là encore d'un retard de mise en place de la montée calcique dans la cellule de Bergmann, comme cela a été observé sur le courant (Time to Peak $_{31-33^\circ\text{C}}=11.08\pm 0.81\text{ min}$; Time to Peak $_{21-23^\circ\text{C}}=27.12\pm 0.71\text{ min}$, $p<0.001$, Figure 36B).

a. Quantification du swelling

Dans le système nerveux central, un des effets délétères de l'ischémie est l'œdème (voir chapitre I-6-d de l'introduction). Dans un épisode OGD *in vitro*, on observe également un gonflement généralisé du tissu qui reflète le « swelling » des cellules. On peut quantifier ce phénomène en mesurant les variations de lumière transmise (Allen et al., 2004 ; voir matériel et méthodes). Dans nos conditions expérimentales, on observe rapidement une augmentation graduelle de la lumière transmise à partir de 4 min d'OGD (Figure 37). Cependant, si à température de 31-33°C on atteint rapidement une valeur « plateau », à température ambiante, le swelling se développe plus lentement (Time to Peak $_{31-33^\circ\text{C}}=14.36\pm 1.19\text{ min}$; Time to Peak $_{21-23^\circ\text{C}}=25.99\pm 1.35\text{ min}$, $p<0.001$, Figure 37B). En revanche, l'amplitude maximale du $\Delta T/T$ ne varie pas significativement entre les deux conditions expérimentales. Cependant, à température ambiante, après 30 min d'OGD, quand on revient à la solution BBS contrôle, le swelling n'a parfois pas atteint un plateau, compliquant l'analyse du « time to peak » dans cette condition de température. La valeur mesurée est donc vraisemblablement légèrement sous estimée. Quoi qu'il en soit, la récupération dans la phase post-OGD n'est toujours que partielle, suggérant qu'un gonflement du tissu persiste après l'épisode ischémique. L'ensemble des résultats montre que l'évolution temporelle et l'amplitude de la réponse de la glie de Bergmann à l'OGD sont fortement dépendantes de la température à laquelle les expériences sont menées. Il reste à savoir si les médiateurs de ce courant sont les mêmes que ceux identifiés à 31-33°C (voir article).

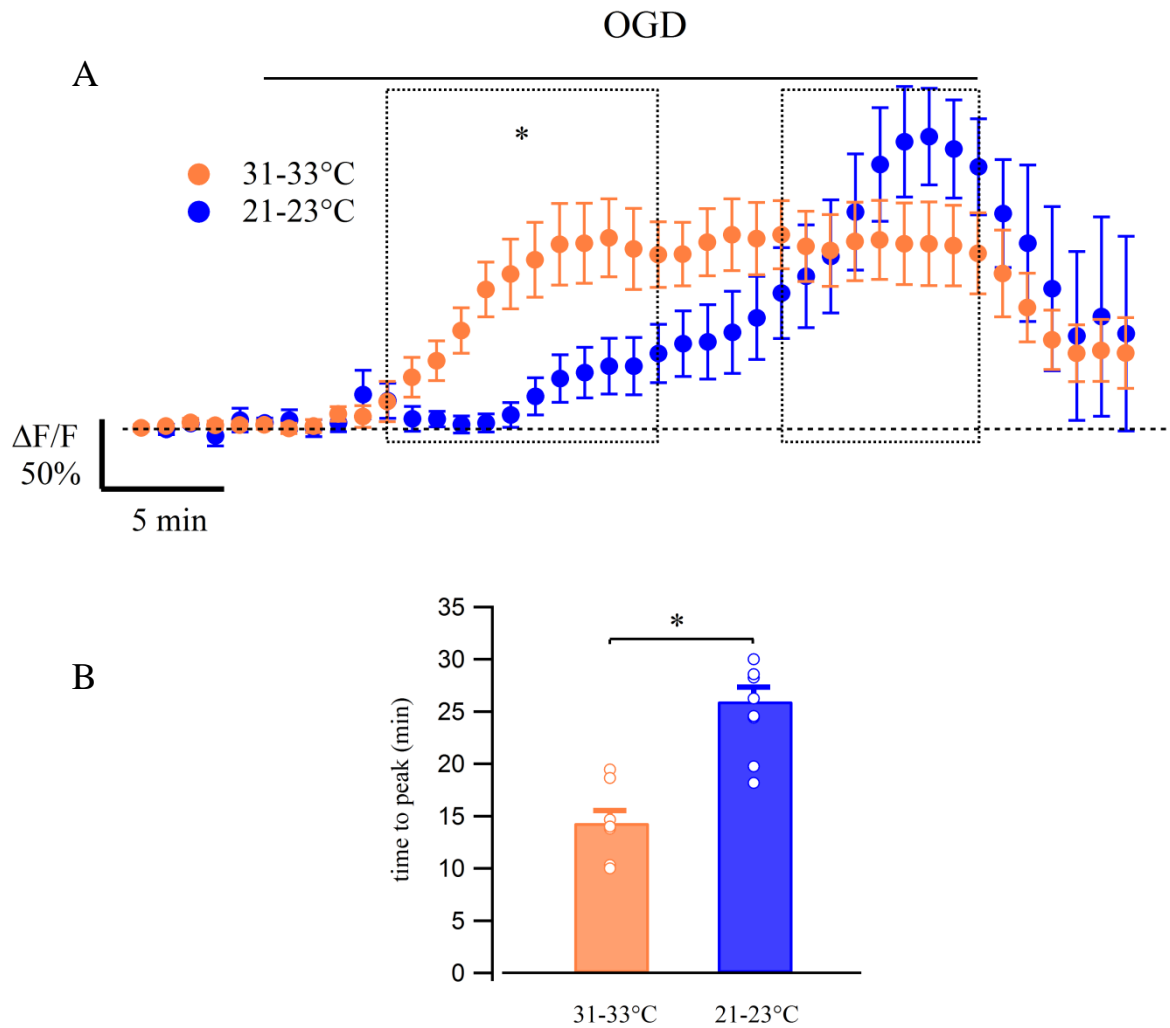


Figure 36 : Variation de calcium cytosolique dans la cellule de Bergmann en réponse à l'OGD dans deux conditions de température.

- A. La montée calcique est significativement ralentie dans des conditions de température ambiante (n=7, bleu) par rapport à la montée de calcium observée dans des conditions de plus fortes températures (n=11, orange).
- B. La dynamique de la montée calcique en réponse à l'OGD est significativement retardée à température ambiante ($p < 0.001$).

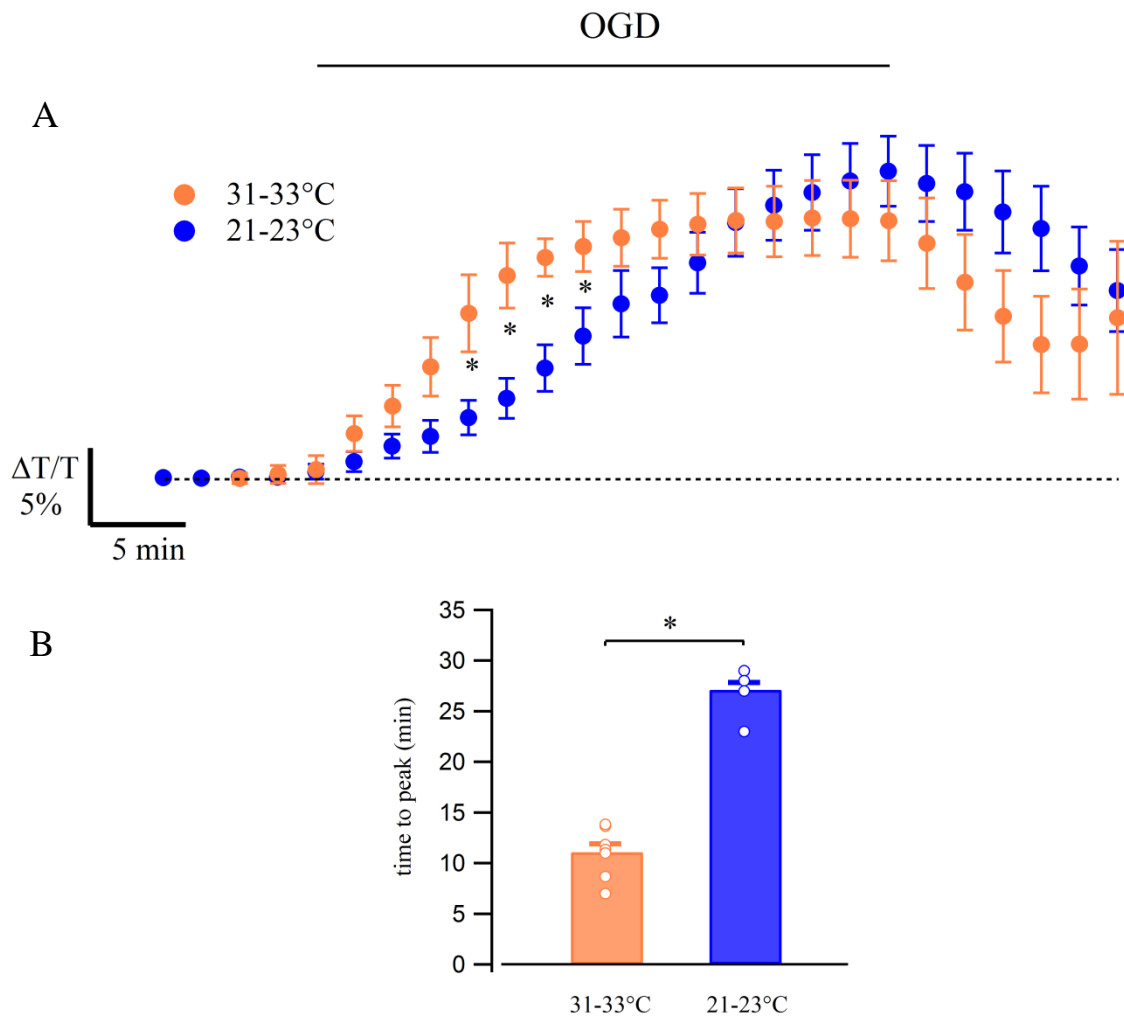


Figure 37 : Variation du swelling au cours de l'OGD

- A. Quantification de la lumière transmise à travers la tranche de cervelet au cours de l'OGD reflétant le phénomène du swelling, en condition de température chaude (n=8, orange) et à température ambiante (n=10, bleu).
- B. La dynamique de la mise en place du swelling en réponse à l'OGD est significativement retardée à température ambiante (p<0.001).

b. Implication putative des récepteurs P2X7 dans la réponse à l'OGD

i. Implication dans le courant induit par l'OGD

Pour répondre à cette question, nous avons adopté deux types d'approches : une approche pharmacologique utilisant un antagoniste spécifique des récepteurs P2X7, l'A-740003, ainsi qu'une approche utilisant des souris mutantes pour lesquelles le récepteur P2X7 a été invalidé (souris P2X7R^{-/-}). En présence de l'A-740003 (10μM), le protocole OGD induit un courant entrant dont la charge est significativement inférieure à celle observée dans les conditions contrôles (Charge_{A740003} = 0.06 ± 0.006 μC ; Charge_{CTR} = 0.1 ± 0.01 μC, P < 0.05, Figure 38A et 38C). En revanche, le blocage des récepteurs P2X7 au cours du protocole d'OGD ne change

pas la cinétique du courant (Figure 38A), comme le montre la quantification du temps pour atteindre le pic du courant OGD (Time to Peak $A_{740003} = 27.7 \pm 0.68$ min ; Time to Peak $CTR = 26.9 \pm 0.9$ min, $p > 0.5$, Figure 38D). Ce résultat a été confirmé par des expériences réalisées sur des souris $P2X7R^{-/-}$ (Figure 38B, 38C et 38D), pour lesquelles on retrouve également une réduction significative de la charge de I_{OGD} (Charge $P2X7R^{-/-} = 0.06 \pm 0.0007$, $P < 0.05$) et un temps pour atteindre le pic de 26.1 ± 1.35 min, non statistiquement différent de celui obtenu pour la population de souris sauvages ($P > 0.5$). Ces résultats démontrent donc que les récepteurs P2X7 sont activés au cours de l'OGD à température ambiante.

ii. Implication dans la montée de Ca^{2+} cytosolique

Les récepteurs P2X7 sont des récepteurs multicaténaires dont l'activation induit des montées de calcium intracellulaire dans la glie de Bergmann (Habbas et al., 2011). On a donc voulu tester si l'activation des récepteurs P2X7 pendant l'OGD contribuait à la réponse calcique de la glie de Bergmann. Pour cela nous avons utilisé l'antagoniste des récepteurs P2X7, l'A740003 (10 μ M). L'exemple représenté sur la figure 39B montre une augmentation de la fluorescence considérablement réduite par rapport à la situation contrôle illustrée en figure 39A. Il s'agit d'une cellule de Bergmann dans laquelle on a observé le plus fort effet de l'A-740003, à savoir une réduction de la fluorescence très marquée par rapport à la situation contrôle (augmentation de seulement 47% de la fluorescence de base). L'analyse des données moyennes permet de mettre en évidence une réduction significative de la montée de Ca^{2+} intracellulaire dans la cellule de Bergmann lors du blocage des récepteurs P2X7. En effet, la quantification de l'aire sous la courbe de la montée calcique montre une réduction significative au cours des 4 dernières minutes du protocole OGD (100 ± 17.9 % en contrôle, contre 46.6 ± 15.1 % en présence d'A-740003, $P < 0.05$). Ces résultats montrent donc une composante due à l'activation des récepteur P2X7 en réponse à l'OGD, dans la montée calcique observée sur les cellules de Bergmann.

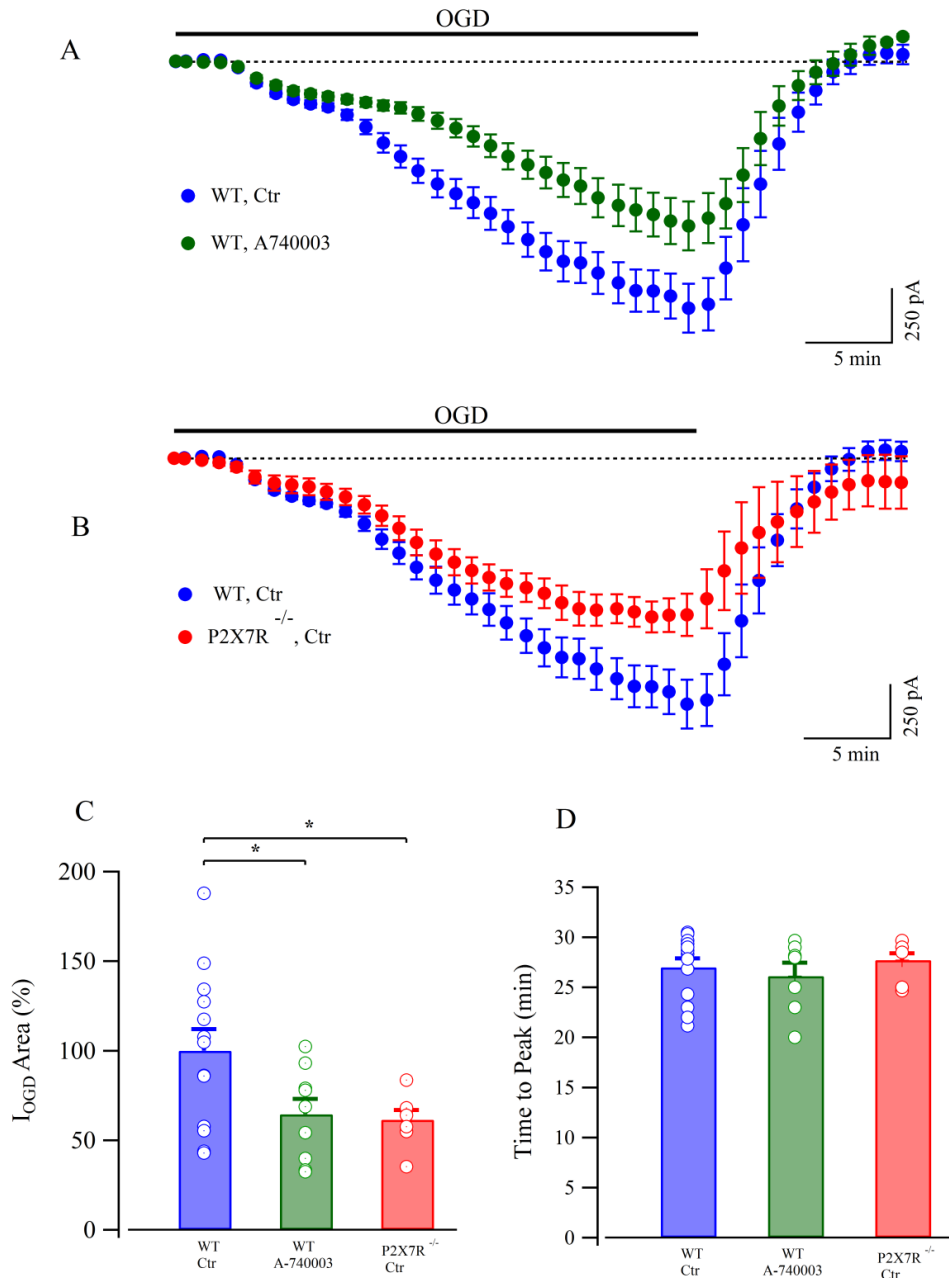


Figure 38 : Implication des récepteurs P2X7 dans le courant induit par l'OGD sur les cellules de Bergmann à température ambiante

- A. Courant moyen induit par l'OGD en absence (n=13, bleu) et en présence d'un antagoniste sélectif des récepteurs P2X7 (A-740003, 10 μ M, n=9, vert)
- B. Courant moyen enregistré chez les souris P2X7R^{-/-} (n=9, rouge) comparé à la moyenne contrôle (bleu).
- C. Valeurs moyennes de la charge électrique relative à I_{OGD} en contrôle (n=13), en présence d'A-740003 (n=9) et chez les souris P2X7R^{-/-} (n=7). Notez qu'il n'y a pas de différence statistique entre les résultats obtenus avec le bloquant pharmacologiques de P2X7 et la souris P2X7R^{-/-} (P>0.5).
- D. Le temps pour atteindre le pic du courant OGD dans ces trois conditions expérimentales n'est pas significativement différent (T_{CTR}=26.99 \pm 0.90 min, n=13 ; T_{A-740003}=27.72 \pm 0.68 min, n=9 ; T_{P2X7R^{-/-}}=26.11 \pm 1.35 min, n=7)

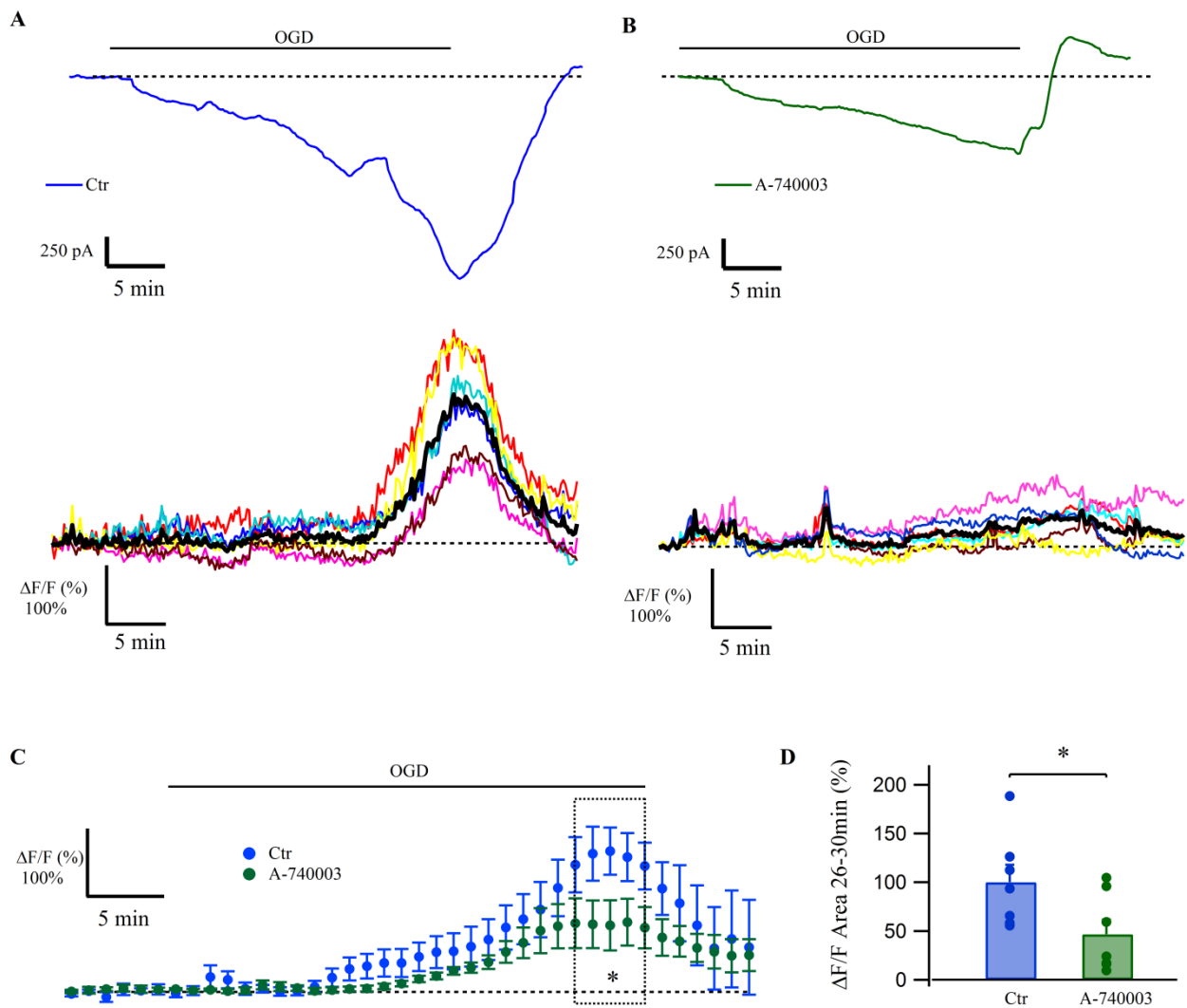


Figure 39 : L'inhibition des récepteurs P2X7 permet de réduire la montée de calcium cytosolique au cours de l'OGD

- Exemple de réponse électrophysiologique (haut) et calcique (bas) d'une cellule de Bergmann en condition contrôlée. Les montées calciques ont été enregistrées sur différentes régions d'intérêt (traces de couleur) et moyennées (trace noire) pour obtenir la variation de fluorescence moyenne pour chaque cellule.
- Exemple de réponse électrophysiologique (haut) et calcique (bas) d'une cellule de Bergmann en présence d'A-740003 (10 μ M).
- Variations moyennes de calcium cytosolique induites par l'OGD en condition contrôlée (n=7, bleu) et en présence d'A-740003 (n=7, vert).
- Quantification de l'aire sous la courbe de la montée calcique entre la 26^{ème} et la 30^{ème} minute du protocole OGD montrant une réduction significative de la montée calcique en présence d'A-740003 (P<0.05).

iii. Implication dans le swelling

Des expériences utilisant l'A-740003 ou la souris P2X7R^{-/-} indiquent que le récepteur P2X7 est également impliqué dans le gonflement du tissu cérébelleux (Figure 40). En effet, on remarque une diminution significative de $\Delta T/T_{max}$ en présence de l'antagoniste P2X7 (n=10, P<0.05, Figure 40B), ou chez la souris P2X7R^{-/-} (n=10, P<0.05, Figure 40B). En revanche, on ne constate pas de retard dans la mise en place du phénomène, par la quantification du « Time to Peak ». En effet, il n'y a aucune différence entre nos trois conditions expérimentales.

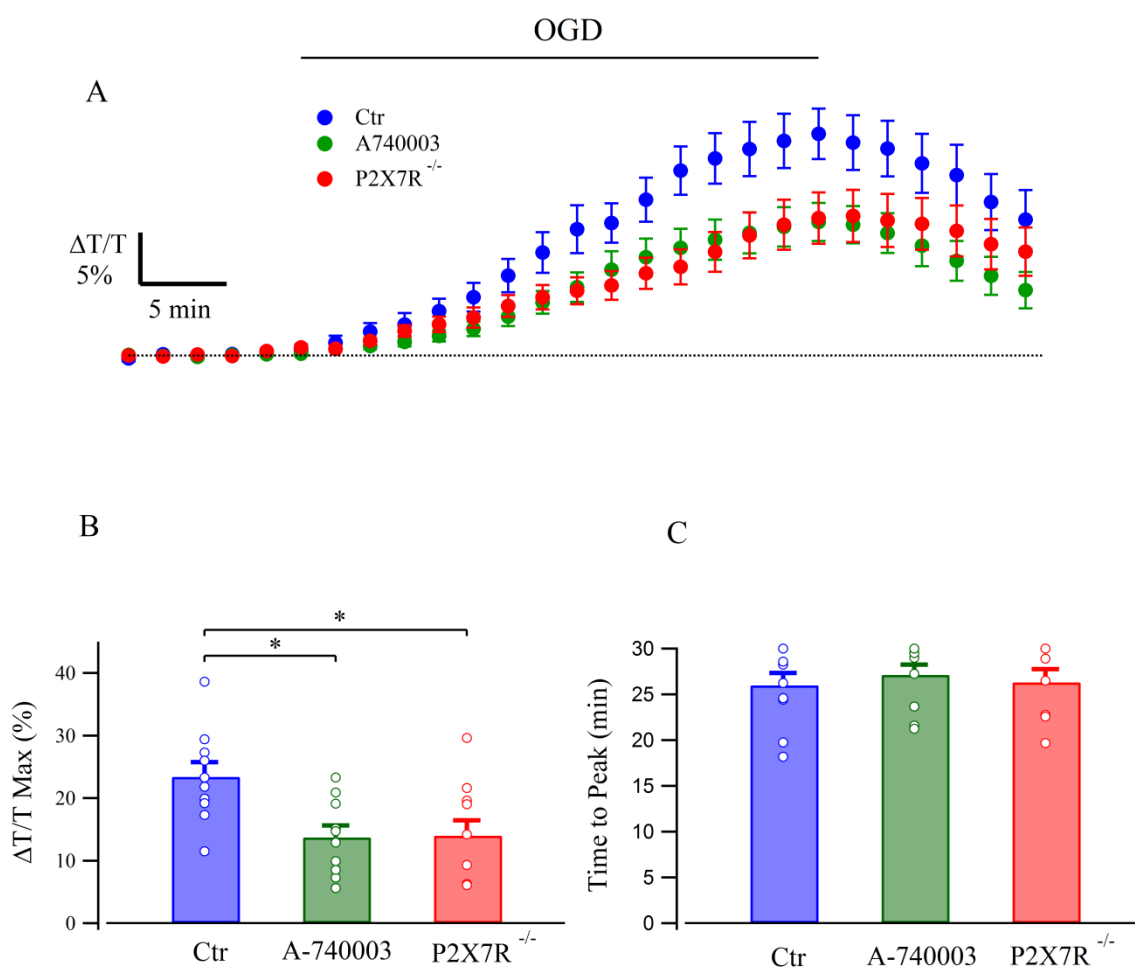


Figure 40 : Réduction du phénomène du swelling par le blocage des récepteurs P2X7

- Quantification de la variation relative de lumière transmise à travers la tranche de cervelet dans des conditions contrôles (n=10, bleu), en présence d'A-740003 (10 μ M, n=10, vert) ou chez des souris P2X7R^{-/-} (n=10, rouge).
- Quantification de $\Delta T/T_{max}$ au sein des trois différents groupes. Le nombre de cellule est le même qu'en A.
- Le temps pour atteindre le pic du swelling dans les trois conditions expérimentales n'est pas significativement différent (P>0.5).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a permis de caractériser la réponse de la glie de Bergmann à un épisode d'ischémie *in vitro* sur tranche de cervelet de souris en utilisant un modèle largement documenté dans la littérature, le modèle de privation d'oxygène et de glucose (Rossi et al., 2000). Nos données nous permettent de tirer les conclusions suivantes :

- ✓ La glie de Bergmann se dépolarise progressivement au cours de l'OGD et le courant dépolarisant est accompagné par une augmentation prolongée de calcium intracellulaire qui résulte de processus physiopathologiques complexes.
- ✓ Le courant induit par l'OGD (I_{OGD}) est, au moins en partie, dû à une augmentation de la concentration de K^+ extracellulaire.
- ✓ La montée de calcium cytosolique se compose de deux phases : une phase précoce impliquant l'activation des récepteurs P2Y entraînant la libération de Ca^{2+} des réserves intracellulaire, et une phase tardive, passant pour l'ouverture de canaux SOCC permettant l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire.
- ✓ L'impact de l'OGD sur la glie de Bergmann est, pour certains aspects, très différent de la réponse de la cellule de Purkinje à cet épisode ischémique. En effet, si la dépolarisation anoxique enregistrée sur la cellule de Purkinje est presque intégralement bloquée par des inhibiteurs des récepteurs AMPA et NMDA, ces mêmes inhibiteurs n'affectent pas la réponse de la cellule de Bergmann.
- ✓ La baisse de la température montre un ralentissement important de la cinétique des réponses ischémiques et une activation des récepteurs P2X7 présents sur la cellule de Bergmann, alors que ces derniers ne semblent pas impliqués lorsque les expériences ont été réalisées à des températures plus physiologiques (31-33°C).

1. Avant propos

Avant la discussion globale de mes travaux, je voudrais me pencher sur la difficulté d'interprétation des données d'électrophysiologie, obtenues sur des cellules gliales qui présentent une résistance membranaire de 20 M Ω au maximum. Cette faible résistance membranaire entraîne en effet une forte sensibilité à tous phénomènes électriques environnants. Les propriétés passives de la glie de Bergmann sont particulièrement documentées comme le montre un travail publié dans « Science » par l'équipe de Kettenmann. Les chercheurs ont tenté d'augmenter la résistance membranaire passive de la cellule de Bergmann en ayant recours à l'application d'un ionophore Ca^{2+} (ionomycine). La montée de Ca^{2+} intracellulaire induit alors une forte augmentation de la résistance membranaire par l'inhibition de canaux K^+ (dépendants du Ca^{2+}). Cette approche quelque peu drastique a permis d'obtenir de meilleures conditions de patch-clamp et de caractériser les récepteurs ionotropiques du glutamate présents sur les cellules de Bergmann (Müller et al., 1992). Cette étude illustre parfaitement la difficulté des études électrophysiologiques sur ce type cellulaire.

Par ailleurs, les drogues ont, dans nos expérimentations, toujours été appliquées dans le milieu de perfusion de la tranche et non en application locale, ce qui conduit à une action de ces composés sur toutes les cellules du réseau neuronal. Ainsi, il est impossible d'exclure des effets indirects des différents agents pharmacologiques, non seulement sur les cellules de Bergmann, mais aussi sur les populations de cellules voisines. De plus, nous avons préféré appliquer les drogues avant l'OGD, et non pas seulement lors de l'apparition du courant I_{OGD} , comme cela a été fait dans plusieurs études (Hamann et al., 2005 ; Mohr et al., 2010). Nous avons donc choisi d'appliquer les différents agents pharmacologiques avant, pendant et après le protocole d'OGD et de comparer les résultats obtenus dans ces conditions avec une population importante de cellules contrôles enregistrée en l'absence de ces outils pharmacologiques.

2. Réponse électrophysiologique de la glie de Bergmann à l'OGD

a. Augmentation de K^+ extracellulaire

L'Une des caractéristiques des astrocytes est leur implication dans la recapture du K^+ extracellulaire. En effet, les astrocytes expriment une forte densité de canaux K^+ qui assurent de nombreux échanges à travers la membrane. Le potentiel transmembranaire de repos est donc plus hyperpolarisé comparé au potentiel transmembranaire des neurones. En conditions physiologiques, suite à l'augmentation de l'activité neuronale, le K^+ extracellulaire va augmenter. Les astrocytes répondent aux variations de concentration de K^+ extracellulaire en suivant l'équation théorique de Nernst (MacAulay et Zeuthen, 2012). En effet, la glie de Bergmann est impliquée dans l'homéostasie du K^+ extracellulaire et va pouvoir « siphonner » l'excès de K^+ extracellulaire qui diffuse à travers le syncytium astrocytaire ou est directement relargué dans les vaisseaux sanguins (voir chapitre II-5-c de l'introduction). Ces propriétés astrocytaires de contrôle du K^+ externe seraient capable de moduler la fréquence de décharge de potentiel d'action de la cellule de Purkinje (Wang et al., 2012).

Au cours d'un épisode d'ischémie cérébelleuse *in vivo*, le K^+ s'accumule dans le milieu extracellulaire (Kraig et al., 1983). Cette augmentation est principalement due à la diminution de la quantité d'ATP intracellulaire disponible au cours de cet épisode. En effet, cette diminution entraîne un arrêt progressif des transports actifs dans la cellule, avec notamment une défaillance de la pompe Na^+/K^+ -ATPase, conduisant à une perte progressive des gradients ioniques et le K^+ s'accumule alors dans l'espace extracellulaire. Nos résultats montrent que la première phase de l'OGD induit une dépolarisation membranaire de la cellule de Bergmann qui est très majoritairement due à l'augmentation de K^+ extracellulaire. L'utilisation de microélectrodes sensibles au potassium a permis de mesurer une augmentation moyenne $\Delta K^+_e = 4.4$ mM de $[K^+]_e$. En utilisant l'équation de Nernst avec une température de 31°C, une augmentation de 4.4 mM de $[K^+]_e$ changerait le potentiel d'équilibre du K^+ de 18.9 mV. Or, durant nos enregistrements, réalisés en courant imposé, la cellule de Bergmann se dépolarise

en moyenne de 22 mV. L'amplitude de la dépolarisation de la cellule de Bergmann est donc très proche de la valeur calculée avec l'équation de Nernst, et nous indique que la cellule de Bergmann se comporte comme une membrane potassique presque parfaite, ceci durant les 10 premières minutes de l'OGD.

Il est intéressant de comparer nos données expérimentales obtenues *in vitro* à celles obtenues lors d'une ischémie cérébelleuse *in vivo*, à la suite d'un arrêt cardiaque chez le rat. Dans ces conditions, une augmentation de $[K^+]_e$ de 40mM a été observée (Kraig et al., 1983), contre une augmentation de 4.4mM dans nos propres expériences. Ceci nous conduit à conclure que notre modèle OGD sur tranche de cervelet est un modèle moins drastique que celui censécutif à l'induction d'une ischémie *in vivo* par arrêt cardiaque. De plus, nos tranches sont perfusées tout au long de nos enregistrements, ce qui induit un lavage partiel des ions, des neurotransmetteurs et de toutes autres molécules libérées dans l'espace extracellulaire au cours de l'OGD. Cela participe sans doute à minimiser les effets de l'ischémie que nous avons générée *in vitro* par rapport à ce qui se passe *in vivo*.

b. Inhibition des conductances potassiques

L'identité précise des canaux potassiques responsables de la recapture du K^+ extracellulaire au cours de l'OGD demeure inconnue à l'heure actuelle. Le $BaCl_2$ a été le bloquant large spectre le plus efficace dans nos expériences, pour réduire le courant I_{OGD} . Dans la littérature, le $BaCl_2$, à des concentrations de 100 μ M, est décrit comme « spécifique » des Kir, des canaux K^+ à rectification entrante (Olsen et al., 2008 ; Tong et al., 2014). En particulier sur la cellule de Bergmann, c'est le sous-type Kir4.1 est fortement exprimé (Higashi et al., 2001 ; Djukic et al., 2007). Cependant, à cette concentration de $BaCl_2$, aucun effet n'a été observé dans nos mains sur le courant I_{OGD} . Nous avons donc testé des concentrations croissantes de $BaCl_2$ (100 μ M, 300 μ M, 1mM, 5mM) au cours de notre protocole d'OGD (données non illustrées). C'est finalement uniquement avec des concentrations de l'ordre du mM qu'une forte réduction de l' I_{OGD} a été observée. Dans la même ligne, l'équipe de Kettenmann par exemple, a étudié les propriétés des canaux K^+ de la glie de Bergmann et a constaté que chez la souris adulte, le $BaCl_2$ 5mM avait un effet inhibiteur très modéré sur les courants K^+ (Muller et al., 1994). Plus récemment, l'équipe de Matsui a également eu recours à l'utilisation de $BaCl_2$ à une concentration de 5mM, pour bloquer une partie des canaux K^+ des cellules de Bergmann (Sasaki et al., 2012). Quoi qu'il en soit, l'utilisation du $BaCl_2$ dans nos conditions expérimentales à ces fortes concentrations pourrait probablement également affecter d'autres canaux potassiques tels que les canaux K^+ à deux pores (Zhou et al., 2009 ; Benesova et al., 2012), ou encore les canaux K^+ dépendants du voltage (Gibor et al., 2004 ; Hibino et al., 2010). Cet effet aspécifique du $BaCl_2$ pourrait en partie expliquer pourquoi l'ajout du TEA en plus du $BaCl_2$ a eu un faible effet additif par rapport à ce qui est observé avec le $BaCl_2$ seul, le TEA étant décrit comme un bloquant large spectre des canaux K^+ (voir Hille, « ion channels of excitable membrane »). Pour conclure, il n'est donc pas possible à l'issue de nos expérimentations de spécifier précisément par notre approche pharmacologique la nature des canaux K^+ impliqués dans l'OGD, mais nous avons démontré que le courant I_{OGD} dans les cellules de Bergmann a, pour une part au moins, une origine potassique.

Cependant, il ne faut pas oublier que les inhibiteurs des canaux potassiques sont appliqués directement dans la solution extracellulaire, en agissant sur l'ensemble du réseau cérébelleux. Comment discerner dans ces conditions, un effet direct de ces inhibiteurs sur les conductances K^+ des cellules de Bergmann d'un effet sur les neurones ? Pour tenter de répondre à cette question, nous avons voulu mesurer la $[K^+]_e$ en présence de $BaCl_2$ et de TEA, mais la membrane potassique de la microélectrode s'est révélée sensible à ces bloquants. Nous n'avons donc pas pu suivre l'évolution de la concentration de K^+ extracellulaire au cours de l'OGD, en présence de $BaCl_2$ et de TEA.

c. Autres acteurs intervenant dans I_{OGD} de la cellule de Bergmann

Après 10 min d'OGD, après avoir atteint une valeur maximale, la $[K^+]_e$ diminue alors que la dépolarisation de la cellule de Bergmann persiste. Le K^+ ne semble donc pas être le seul acteur impliqué dans la dépolarisation de la cellule de Bergmann. Néanmoins, il est important de noter que même si l'augmentation de $[K^+]_e$ diminue, la concentration de K^+ reste supérieure à la valeur initiale dans le liquide extracellulaire ($\Delta K^+_e = 1.32$ mM), ce qui pourrait contribuer en partie à une dépolarisation persistante de la cellule de Bergmann.

Au-delà du rôle majeur du K^+ dans la phase initiale de la dépolarisation de la cellule de Bergmann lors de l'OGD, d'autres acteurs moléculaires sont sans aucun doute impliqués dans la dépolarisation persistante observée. Une étude récente sur l'ischémie cérébelleuse montre que l'acidification des cellules de Bergmann induit la libération de glutamate par ces cellules gliales (Beppu et al., 2014). En effet, la privation d'oxygène durant l'ischémie entraînant rapidement à la production de protons et de lactate, suite à la glycolyse anaérobie causant rapidement une acidification du milieu intracellulaire dans les astrocyte (Rossi et al., 2007). Cette libération de glutamate dépendant de l'acidification intracellulaire pourrait passer par l'activation de canaux $ClC-2$ très exprimés sur ces cellules gliales (Blanz et al., 2007, Jeworutzki et al., 2012). Il s'agit d'une famille de canaux anioniques dépendants du voltage, dont la mise en évidence sur les cellules gliales est souvent compliquée par la forte expression de conductances potassiques passives qui dominent les courbes I/V (Kimelberg et al., 2004). A côté de ces conductances on doit aussi mentionner les canaux VRAC, « Volume Regulated Anion Channels », qui sont activés par des changements osmotiques ou de volume extracellulaire entraînant la libération d'acides aminés tels que le glutamate et l'aspartate (Cavalier et Attwell, 2005 ; Liu et al., 2009 ; Hamilton et Attwell, 2010 ; Kettenmann et Ransom, « Neuroglia »). En conditions ischémiques, on observe un gonflement important des tissus (voir chapitre III-3-b de l'introduction, et nos résultats préliminaires), ce qui représenterait une condition d'activation des VRACs. Nous avons testé le DIDS (Bloquant de plusieurs types de canaux anioniques) au cours de notre protocole OGD, et nous avons observé une réduction de I_{OGD} d'environ 50%. Ce résultat suggère que la sortie de glutamate (chargée négativement) de la cellule de Bergmann pendant l'OGD pourrait contribuer à l' I_{OGD} . Cependant le mode d'action du DIDS n'est pas encore clairement identifié, et semble assez peu spécifique, aussi l'interprétation des résultats obtenus demande la plus grande

prudence. En effet, au delà de son action sur l'ensemble des conductances anioniques de type CIC (Wulff, 2008) et VRAC, le DIDS pourrait également affecter différents transporteurs tels que le co-transporteur électrogénique $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (Tauskela et al., 2003 ; Romero et al., 2004 ; Romero et al., 2013). Ce transporteur est connu pour fonctionner en lien étroit avec la régulation du pH : l'alcalinisation du milieu intracellulaire entrainerait une entrée de Na^+ et de HCO_3^- pour une stœchiométrie de 1 : 2, générant ainsi un courant hyperpolarisant (Deitmer, 2007). On peut imaginer qu'en conditions ischémiques, l'acidification du milieu intracellulaire pourrait entrainer une inversion de ce co-transporteur, générant ainsi un courant dépolarisant.

L'utilisation du DIDS dans nos conditions expérimentales pourrait donc avoir de multiples effets sur la glie de Bergmann, aussi la réduction du courant I_{OGD} que nous avons observé lors de son utilisation reste sujette à de multiples interprétations.

d. Les récepteurs du glutamate ne sont pas impliqués dans la dépolarisation de la cellule de Bergmann

La littérature montre que la grande majorité de la dépolarisation anoxique enregistrée sur les cellules de Purkinje est bloquée par l'ajout d'APV et de NBQX qui inhibe la transmission glutamatergique ionotropique (Hamann et al., 2005 ; Brady et al., 2010 ; Mohr et al., 2010). Un résultat important et surprenant de notre travail est le fait que la cellule de Bergmann ne semble pas subir l'excitotoxicité du glutamate pendant l'OGD. Ce résultat est tout à fait surprenant car les cellules de Bergmann expriment les récepteurs AMPA les plus perméables au Ca^{2+} du cerveau (Geiger et al., 1995). Au-delà des conditions pathologiques de l'ischémie, dans des conditions physiologiques basales, ces récepteurs sont activés par la libération de glutamate par les fibres parallèles ou grimpantes (Clark et Barbour, 1997 ; Matsui et Jahr, 2003). Cependant, les récepteurs AMPA des cellules de Bergmann ne semblent pas être exprimés à proximité des sites actifs des synapses, mais plutôt localisés dans un territoire éloigné des boutons synaptiques (Matsui et al., 2006). Dans la glie de Bergmann, le courant dépendant des récepteurs AMPA est très rapidement réduit pendant une stimulation électrique à haute fréquence ou à basse fréquence des fibres parallèles (Bellamy et Ogden, 2005). Il a ainsi été suggéré que les sites de libération ectopique de glutamate (hors zone synaptiques actives proprement dites) sont dépourvus des mécanismes de recyclage rapide des vésicules de glutamate (Balakrishnan et al., 2011) et présentent des propriétés singulières (Matsui et Jahr, 2004 ; Bellamy et Ogden, 2005). L'augmentation globale de l'excitabilité durant l'OGD accompagnée par la libération de glutamate accrue, y compris au niveau de sites ectopiques, pourrait expliquer l'absence de contribution des récepteurs AMPA des cellules de Bergmann au courant I_{OGD} .

Par ailleurs, la recapture du glutamate à travers les transporteurs du glutamate est un mécanisme électrogène dépendant principalement du gradient sodique (Grewer et Rauen, 2005). La cellule de Bergmann étant fortement impliquée dans la recapture du glutamate, une partie du courant I_{OGD} pourrait refléter la recapture du glutamate. Pour tester cette hypothèse nous avons bloqué la recapture du glutamate par l'utilisation du TBOA. Le TBOA ne permet

pas de réduire la charge de I_{OGD} , indiquant que la recapture du glutamate ne participe pas ou peu à la mise en place de la dépolarisation de la cellule de Bergmann. En revanche, nous observons une accélération de la réponse de la cellule de Bergmann à l'OGD. Ces résultats obtenus en présence de TBOA ne sont pas contradictoires avec ceux décrits avec les antagonistes des récepteurs ionotropiques du glutamate (APV et NBQX). En effet, bloquer la recapture du glutamate conduit à une augmentation de la concentration de glutamate ambiant dans le milieu extracellulaire, et par conséquent entraîne une excitation plus rapide du réseau neuronal. L'accélération de la réponse de la cellule de Bergmann à l'OGD refléterait donc un effet indirect de l'augmentation de l'excitabilité neuronale environnante. Par ailleurs, il a été montré récemment que le TBOA anticiperait également la réponse de la cellule de Purkinje à l'OGD (Beppu et al., 2014). Il sera donc très intéressant de mesurer la concentration de K^+ extracellulaire en présence de TBOA pour voir s'il existe une corrélation entre l'accélération de I_{OGD} des cellules de Bergmann et l'augmentation du K^+ extracellulaire.

3. Réponse calcique de la glie de Bergmann à l'OGD

Une forte montée de calcium cytosolique a été enregistrée au sein de la cellule de Bergmann au cours de l'OGD. Cette montée de calcium n'est pas due à l'activation des récepteurs AMPA sur les cellules de Bergmann, corroborant les résultats obtenus sur l'analyse du courant induit par l'OGD. Nous avons donc recherché les acteurs potentiellement impliqués dans cette augmentation de calcium cytosolique.

a. Phase précoce de la montée calcique

Nos résultats suggèrent que de l'ATP serait relargué au cours du protocole OGD, conduisant à l'activation des récepteurs P2Y présents sur les cellules de Bergmann. Plusieurs études ont montré que la concentration d'ATP extracellulaire augmente au cours d'un épisode ischémique *in vivo* (Kharmalov et al., 2002 ; Franke et al., 2006). De plus, l'utilisation du PPADS, antagoniste à large spectre des récepteurs P2, réduit considérablement les lésions ischémiques dans le cortex (Lammer et al., 2006). Nos résultats montrent que pendant les premières minutes d'OGD, le PPADS inhibe complètement la montée calcique des cellules de Bergmann, sans pour autant affecter le courant I_{OGD} . Ce résultat suggère que la montée calcique initiale est due à l'activation des récepteurs métabotropiques P2Y qui possèdent une haute affinité pour l'ATP, et dont l'activation mobilise les stocks intracellulaires de Ca^{2+} (Beierlein et Regehr, 2006 ; Piet et Jahr, 2007). Nous en voulons pour preuve que la « vidange » des réserves intracellulaires de calcium consécutif au blocage de la pompe SERCA, conduit aux mêmes effets que ceux observés avec le PPADS, confirmant l'origine interne de cette composante calcique.

b. Phase tardive de la montée calcique

Les expériences menées sur les cellules de Bergmann dans un milieu externe dépourvu de Ca^{2+} extracellulaire ont été très difficiles à réaliser, car il s'agit de conditions expérimentales

drastiques pour les cellules. En effet, beaucoup de cellules n'ont pas survécu à l'apport de solution dépourvue de calcium, ni au protocole d'OGD réalisé dans ces conditions. Tout de même, nos résultats montrent une forte réduction de la montée de calcium cytosolique ce qui conduit à conclure à une entrée de Ca^{2+} extracellulaire dans la cellule de Bergmann au cours de la phase tardive de la montée calcique déclenchée par l'OGD. D'après nos résultats obtenus en présence de 2-APB, l'entrée de calcium du milieu extracellulaire se fait vraisemblablement par des canaux SOCE, connus pour être présents sur les cellules de Bergmann (Singaravelu et al., 2006).

En revanche, on constate également une réduction de la montée calcique précoce à la fois au cours des expériences réalisées en l'absence de Ca^{2+} extracellulaire, mais également en présence de 2-APB. Ces deux résultats ne sont pas contradictoires avec la libération de Ca^{2+} des stocks intracellulaires observée au cours de la phase précoce de la montée calcique. En effet, ces deux conditions particulières pourraient affecter les stocks calciques intracellulaires du réticulum endoplasmique, car ceux-ci se reforment d'ordinaire à partir de l'entrée de calcium depuis le milieu extracellulaire. Il est donc tout à fait possible d'affecter les stocks de calcium intracellulaire dans ces conditions. De plus, même si la première phase de la montée calcique est significativement réduite en amplitude, elle ne l'est pas en dynamique ($L_{\text{Ctr}}=11.08\pm 0.81$ min ; $L_{\text{Ca}^{2+}\text{-free}}=12.16\pm 1.13$ min ; $L_{2\text{-APB}}=12.45\pm 1.46$ min ; $P>0.5$). Ces derniers résultats confirment donc que la montée précoce est due à une libération de Ca^{2+} des stocks intracellulaire, tandis que la montée tardive est due à l'entrée de calcium du milieu extracellulaire.

4. Différences observées au cours de l'OGD à température ambiante (21-23°C) par rapport à une température plus proche des conditions physiologiques (31-33°C).

a. Cinétique de la réponse OGD

La température semble un acteur pouvant être déterminant dans les phénomènes pathologiques liés à l'ischémie. En effet, l'hypothermie semblerait améliorer la récupération de certains patients (Ntaios et al., 2015) et cette stratégie est déjà appliquée chez les nouveaux nés (Saigal et al., 2015). Chez l'animal, et notamment pour les cellules de Purkinje du cervelet, l'effet d'une diminution de la température a été étudié *in vitro*. En effet, des différences de cinétiques de réponses de la cellule de Purkinje à la suite d'un protocole d'OGD sont observées en fonction de la température à laquelle les expériences sont menées. En effet, les expériences se déroulant à température ambiante (22°C - 23°C) présentent une cinétique ralentie par rapport aux expériences réalisées à température plus physiologiques (32°C – 34°C) (Mohr et al., 2010).

Nous avons obtenu des résultats similaires sur la cellule de Bergmann. En effet, le ralentissement observé au cours de l'ischémie à température ambiante peut s'expliquer par un ralentissement de l'ensemble des réactions enzymatiques très dépendantes de la température.

b. Activation des récepteurs P2X7

Les résultats présentés dans l'article (voir Figure 5 du papier) indiquent que les récepteurs P2X7 ne sont pas activés lors de l'OGD lorsque les expériences sont réalisées à 31-33°C. En revanche, les résultats obtenus à température ambiante ne permettent pas de tirer les mêmes conclusions. En effet ces derniers montrent une implication des récepteurs P2X7 :

- ✓ Dans le courant I_{OGD} de la cellule de Bergmann.
- ✓ Dans la montée de Ca^{2+} intracellulaire.
- ✓ Dans le décours temporel du « swelling » qui accompagne l'OGD.

On sait que la concentration d'ATP extracellulaire est finement contrôlée par l'action d'enzymes de dégradation qui convertissent l'ATP en ADP, AMP, ou adénosine (Figure 41). Or l'action des enzymes est, de façon générale, dépendante de la température. Il est donc possible qu'à la température de 31-33°C, l'ATP libéré dans le milieu extracellulaire au cours de l'OGD soit plus efficacement dégradé qu'à température ambiante. Ceci empêcherait l'accumulation d'ATP à des concentrations assez élevées (~1mM) pour activer les récepteurs P2X7 à faible affinité. Pour confirmer cette hypothèse, il serait très intéressant d'utiliser des inhibiteurs des enzymes de dégradation de l'ATP, comme le PV4 (Melani et al., 2012), afin de retrouver une implication potentielle des récepteurs P2X7 à 31-33°C.

Le rôle des récepteurs P2X7 au cours de l'ischémie est encore largement débattu (Arbeloa et al., 2012 ; Leichsenring et al., 2013 ; Bai et Li, 2013). Deux publications récentes ont étudié ce rôle et ont fourni des résultats discordants (Arbeloa et al., 2012 ; Leichsenring et al., 2013). Ceci pourrait s'expliquer par des différences expérimentales, telles la température à laquelle sont réalisées les expériences, l'âge des animaux ou la région du cerveau étudiée. Nos résultats obtenus sur l'implication des récepteurs P2X7 au cours de l'ischémie, apportent des éléments de réponse sur les divergences de la littérature illustrées ci-dessus.

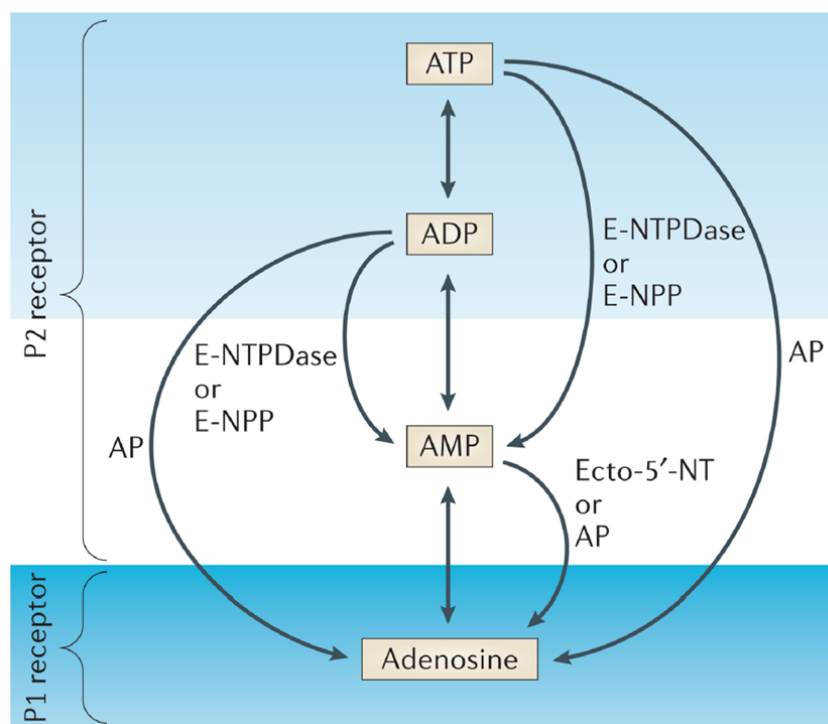


Figure 41 : Les ectonucléotidases, enzymes de dégradation de l'ATP et de ces dérivés

L'ATP extracellulaire est rapidement dégradé en ADP, AMP et adénosine par l'action de différentes ectonucléotidases (D'après Fields et Burnstock, 2006). AP: Alcaline phosphatase, Ecto-5'-NT: l'ectonucléotidase 5', E-NPP: Ectophosphodiesterase/nucleotide phosphohydrolase.

5. Rôles de la glie de Bergmann dans l'ischémie

Les astrocytes sont connus pour leurs nombreux rôles dans les processus physiologiques (voir chapitre II-5 de l'introduction) mais également pour leur implication dans les phénomènes pathologiques (voir chapitre III-8 de l'introduction). Cependant, dans certains cas pathologiques tels que l'ischémie, il est encore difficile de « trancher » sur le rôle « bénéfique » ou « délétère » que pourraient exercer les astrocytes.

Dans le cervelet, un lien fonctionnel important entre les cellules de Purkinje et les cellules de Bergmann a récemment été mis en évidence au cours de l'ischémie. En effet, l'acidification due à l'OGD des cellules de Bergmann, entrainerait la libération de glutamate qui aurait un effet excitotoxique pour les neurones de Purkinje (Beppu et al., 2014). De plus, les auteurs montrent dans cette étude que si, pendant une attaque ischémique *in vivo*, on alcalinise le cytosol des cellules de Bergmann, les lésions cérébelleuses sont fortement atténuées. Cet élégant travail qui utilise l'optogénétique *in vitro* et *in vivo* a mis en évidence un rôle délétère des cellules de Bergmann vis-à-vis des cellules de Purkinje.

A la suite de notre étude, il n'est pas possible d'apporter des conclusions fermes sur un rôle défini des cellules de Bergmann dans les mécanismes conduisant à la « mort » des cellules de Purkinje. De plus il est difficile de dire si les cellules de Bergmann sont plus résistantes à

l'ischémie que les cellules de Purkinje. En effet, lors des enregistrements appariés réalisés entre cellule de Bergmann et cellule de Purkinje, on voit clairement que le courant dépolarisant enregistré dans la cellule de Bergmann se développe avant la dépolarisation anoxique de la cellule de Purkinje. Cependant, ceci n'implique pas que la cellule de Bergmann soit effectivement plus « fragile » que la cellule de Purkinje. En effet, pendant la première phase de l'OGD, la dépolarisation de la cellule de Bergmann est concomitante de l'augmentation de K^+ extracellulaire. Cette accumulation de K^+ se traduit également sur les cellules de Purkinje par une augmentation de la fréquence des courants post-synaptiques, un indice de l'excitabilité accrue du réseau cérébelleux suite à l'OGD. Cette dépolarisation précoce qui suit la montée de $[K^+]_e$ pourrait donc indiquer que la glie de Bergmann intervient rapidement dans la recapture du K^+ extracellulaire. Cependant, ce n'est pas le K^+ qui semble délétère pour la cellule de Purkinje, mais le glutamate accumulé dans le milieu extracellulaire, induisant des courants de plusieurs nA dans la cellule de Purkinje. Selon le groupe de Matsui, une partie de ce glutamate est libéré par la glie de Bergmann (Beppu et al., 2014).

Finalement, on observe une récupération totale du courant membranaire pour la cellule de Bergmann, tandis que la cellule de Purkinje ne récupère généralement que partiellement. Néanmoins, il reste difficile d'extrapoler une meilleure résistance à l'ischémie d'un type cellulaire par rapport à l'autre, uniquement avec cette information. En effet, cet effacement total du courant induit par l'OGD, n'implique pas forcément une récupération fonctionnelle. En effet, même quand on inhibe les récepteurs ionotropiques du glutamate responsables de la dépolarisation anoxique, on observe la mort cellulaire d'un très grand nombre de cellules de Purkinje, indiquant que courant I_{OGD} et mise en place de l'apoptose ne sont pas nécessairement corrélés (Mohr et al., 2010).

Il serait intéressant d'étudier la mort cellulaire des cellules de Bergmann suite à l'OGD. Ceci pourrait être fait en utilisant un marquage au iodure de propidium sur des tranches de cervelet ayant subi, ou pas, l'OGD. Pour observer les cellules de Bergmann, on pourrait utiliser des souris transgéniques, disponibles au laboratoire, qui exprime la GFP dans les cellules astrocytaires (Figure 42).

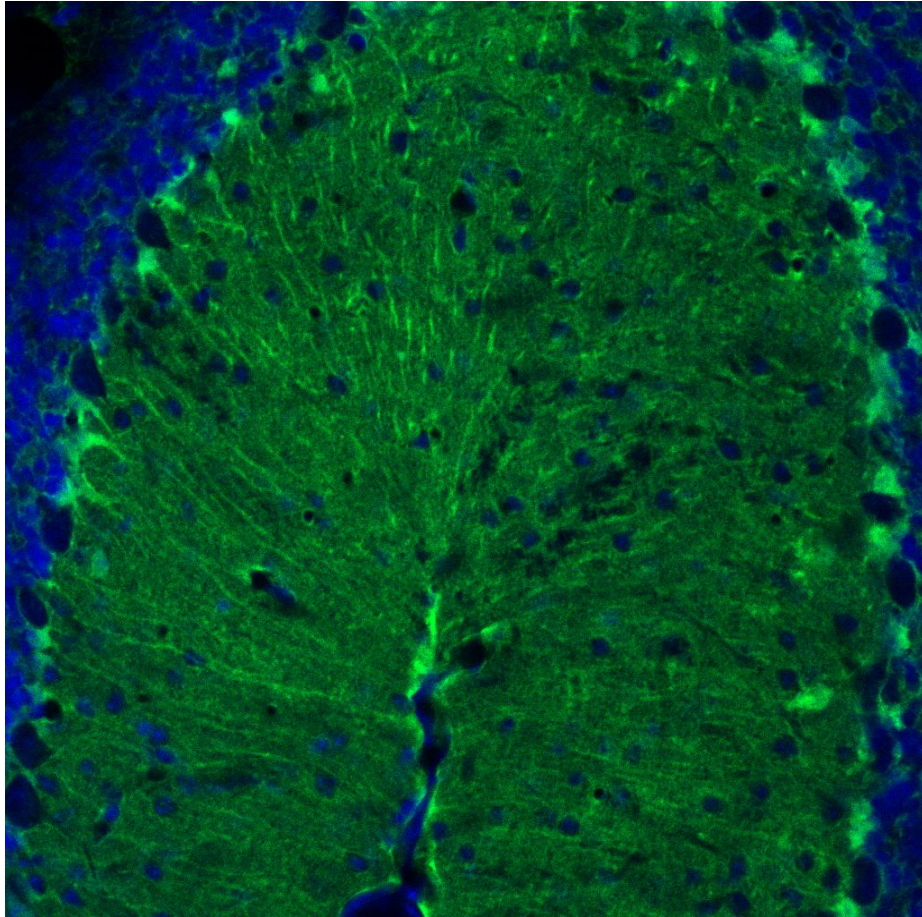


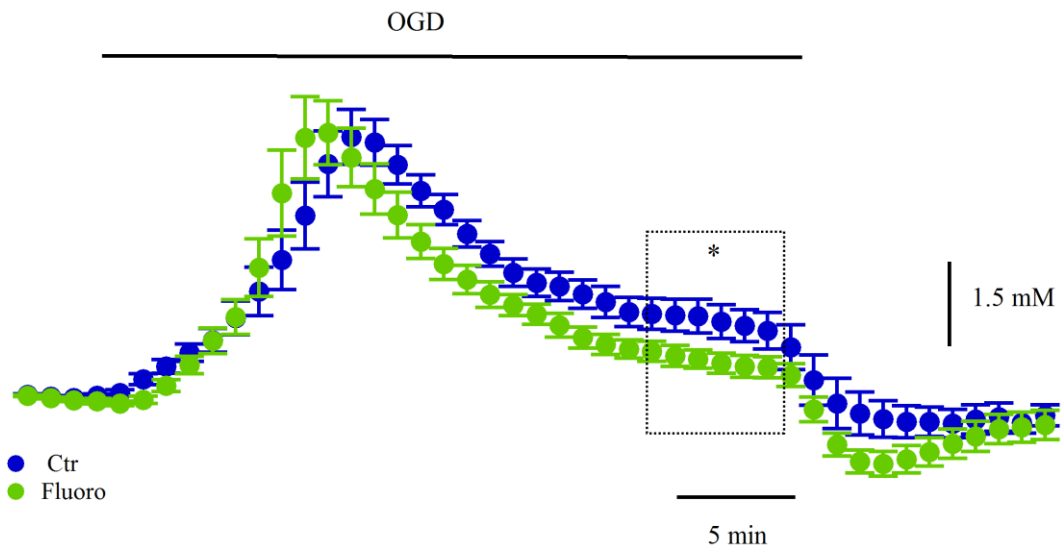
Figure 42 : Visualisation des cellules de Bergmann

Cellules de Bergmann révélées par anticorps anti GFP (vert). La GFP est exprimée sous contrôle du promoteur *ALDH1L1*, présent dans les seuls astrocytes. Visualisation des noyaux par marquage au DAPI (bleu). Seules les cellules de Bergmann et les astrocytes de la couche granulaire expriment la GFP (source personnelle).

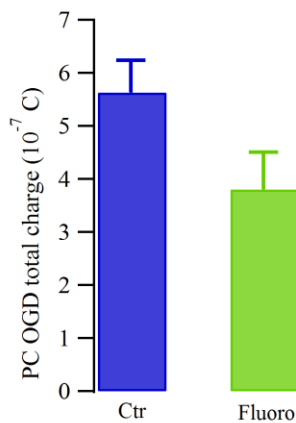
6. Inhibition du métabolisme gliale

Pour tenter de mettre en évidence le rôle fonctionnel des cellules de Bergmann dans l'ischémie, et d'étudier l'impact sur les cellules de Purkinje, on a tenté d'inhiber le métabolisme des astrocytes *in situ*. Pour cela, on a décidé d'utiliser une drogue, le fluorocitrate, connu pour inhiber le cycle de Krebs dans les astrocytes (Hassel et al., 1992 ; Vance et al., 2015).

A



B



C

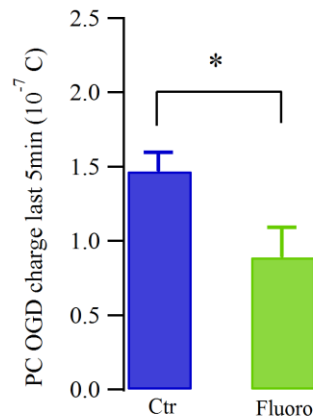


Figure 43 : Effet du fluorocitrate sur la $[K^+]_e$ et le courant de la cellule de Purkinje

- A. Variation moyenne de la concentration de K^+ extracellulaire au cours de l'OGD en condition contrôle (n=8) et après incubation des tranches en fluorocitrate (n=8). Il n'y a pas de différences majeures dans les deux conditions expérimentales à l'exception d'une valeur de $[K^+]_{ext}$ plus faible avec la phase finale de l'OGD avec les tranches incubées avec le fluorocitrate.
- B. Valeurs moyennes de la charge électrique relative à IOGD des cellules de Purkinje en contrôle (n=8) et après incubation en fluorocitrate (n=8).
- C. Valeurs moyennes de la charge électrique relative à I_{OGD} des cellules de Purkinje au cours des 5 dernières minutes de l'OGD en condition contrôle (n=8) et après incubation en fluorocitrate (n=8). Dans cette phase tardive de l'OGD, le fluorocitrate réduit significativement I_{OGD} .

Les résultats obtenus sont illustrés sur la figure 43. Après 30 à 60 min d'incubation en fluorocitrate, notre première constatation est la difficulté à enregistrer en patch clamp les cellules de Bergmann, alors qu'elles sont aisément identifiables sous le microscope. En

revanche, il n'y a aucun problème pour enregistrer les cellules de Purkinje, ce qui nous a conforté dans l'idée que le fluorocitrate a eu un effet sélectif sur les astrocytes comme décrit dans la littérature. Nous avons donc par la suite mesuré les variations de $[K^+]$ extracellulaire et nous les avons comparées à celles obtenues avec des tranches non-traitées (Figure 43A). La concentration de K^+ extracellulaire augmente rapidement et atteint une valeur maximale qui n'est pas significativement différente de la valeur contrôle ($\Delta K^+_{e \text{ Fluorocitrate}} = 5.8 \pm 0.7 \text{ mM}$, $n=8$ contre $\Delta K^+_{e \text{ contrôle}} = 5.3 \pm 0.2 \text{ mM}$, $n=8$, $P > 0.05$). Puis, la concentration de K^+ extracellulaire diminue, jusqu'à atteindre une valeur stable significativement inférieure à la valeur contrôle ($\Delta K^+_{e \text{ Fluorocitrate}} = 0.5 \pm 0.2 \text{ mM}$, $n=8$ contre $\Delta K^+_{e \text{ contrôle}} = 1.3 \pm 0.3 \text{ mM}$, $n=8$, $p < 0.05$). Nous avons ensuite voulu voir s'il y avait un changement de courant I_{OGD} dans les cellules de Purkinje, suite à une incubation en présence de cette gliotoxine. Comme indiqué en figure 43B, les cellules de Purkinje ont une tendance à développer des courants plus petits qu'en condition contrôle ($\text{Charge}_{\text{Fluorocitrate}} = 3.0 \pm 0.8 \cdot 10^{-7} \text{ C}$, $n=8$, $\text{Charge}_{\text{contrôle}} = 5.6 \pm 1.0 \cdot 10^{-7} \text{ C}$, $n=8$, $p > 0.05$), mais sans que cette différence soit significative. En revanche, en correspondance avec la réduction significative du plateau de ΔK^+_e , on observe une réduction significative de la charge de I_{OGD} au cours des 5 dernières minutes du protocole (Figure 43C).

Ces résultats sont pour l'heure un peu décevants car, compte tenu de l'effet non significatif du fluorocitrate, ils ne nous permettent pas d'émettre une hypothèse solide sur le rôle des cellules de Bergmann dans ces conditions. Cependant, le peu de différence observé lors de l'utilisation du fluorocitrate pourrait être dû au faible effet de l'agent pharmacologique sur les cellules de Bergmann. Malheureusement, nous n'avons pas encore pu tester plus avant l'efficacité de ce traitement pharmacologique.

7. Perspectives

Nous voudrions par la suite poursuivre l'étude du rôle fonctionnel de la cellule de Bergmann dans l'homéostasie potassique et hydrique ceci dans des conditions physiologiques ainsi que dans des conditions pathologiques.

a. Conditions physiologiques

Afin d'induire une dépolarisation synchrone d'une population de cellules de Purkinje, nous utiliserons des souris qui expriment le canal sensible à la lumière rhodopsine-2 (ChR2), sous le contrôle du promoteur L7 spécifique des neurones de Purkinje (Chaumont et al., 2013). Grâce à cet outil « d'optogénétique », on pourra simultanément et spécifiquement activer un groupe de cellules de Purkinje grâce à l'illumination de la tranche par un faisceau de lumière bleue, et en enregistrer l'impact sur la concentration du K^+ externe et sur le potentiel membranaire des cellules de Bergmann. Mon travail de thèse a montré que la glie de Bergmann est très sensible aux variations de K^+ extracellulaire. En condition physiologiques, des doubles enregistrements préliminaires cellule de Bergmann – cellule de Purkinje,

montrent clairement que la dépolarisation de ces neurones par la lumière génère une dépolarisation de la glie de Bergmann (données non illustrées). Ces données viennent renforcer notre thèse que le K^+ est l'ion qui permet le « dialogue » entre cellules de Purkinje et cellules de Bergmann. Pour consolider notre hypothèse, nous poursuivrons nos enregistrements en double patch et en parallèle nous effectuerons des mesures de K^+ extracellulaire par microélectrode.

b. Conditions pathologiques : modèle murin déficient en dystrophine de type Dp71

Au cours de ma thèse, j'ai focalisé mon attention sur les conditions pathologiques particulières de l'ischémie cérébrale. Cependant, la dysrégulation de l'homéostasie potassique et hydrique a également été décrite dans des pathologies autres que l'ischémie cérébrale.

Dans la glie radiaire de la rétine et dans les astrocytes du cervelet, par exemple, il a été montré que l'assemblage des canaux potassiques Kir4.1 et des aquaporines AQP4 dépend fortement de l'expression du complexe de protéines associées à la dystrophine (Fort et al., 2008; Nicchia et al., 2008). Cette protéine du cytosquelette est normalement présente dans le muscle, mais également dans le système nerveux central. La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) résulte de mutations du gène DMD codant pour les dystrophines. La sévérité du déficit cognitif est liée au profil des mutations qui peuvent affecter plusieurs isoformes de dystrophines cérébrales (Dp427, Dp140, Dp71), et conduire à des altérations cumulées des systèmes GABAergiques et glutamatergiques et de la barrière hématoencéphalique (Perronnet & Vaillend, 2010). La perte de Dp71 conduit aux retards mentaux les plus sévères dans la DMD. Les conséquences de la perte de Dp71 sont complexes, car cette protéine joue un rôle à la fois dans les neurones et dans les cellules gliales.

Au cours de ma thèse, j'ai également étudié la transmission synaptique glutamatergique du cortex cérébelleux chez la souris Dp71. Mes résultats montrent une altération de la transmission à la synapse fibre grimpanche – cellule de Purkinje chez la souris knock-out pour la Dp71 et feront l'objet d'une publication prochaine (données non illustrées).

Dans les astrocytes du cortex cérébelleux, la Dp71 est localisée au niveau des prolongements des cellules de Bergmann, dans les pieds astrocytaires périvasculaires et dans la glie limitante (Amiry-Moghaddam et al., 2004; Nicchia et al., 2008), où elle joue un rôle dans l'organisation des canaux potassiques Kir4.1 et des canaux aquaporine (AQP4). Ceci suggère un rôle potentiel de la Dp71 dans les mécanismes qui régulent d'une part les fonctions de l'homéostasie potassique et hydrique et indirectement d'autre part, certaines propriétés neuronales dépendantes de l'interface neurone-glie. Grâce à l'utilisation de souris knock-out pour la Dp71, nous étudierons les conséquences d'une altération Dp71-dépendante des protéines Kir4.1 et AQP4 sur la physiologie des cellules de Bergmann. Nous comparerons les propriétés de la glie de Bergmann des souris sauvages et Dp71^{-/-}, en se focalisant particulièrement sur la mesure des propriétés passives de la glie de Bergmann et sur sa

capacité de « siphonnage » du K^+ extracellulaire en réponse à la stimulation d'une cellule de Purkinje, ou d'une population de cellules de Purkinje.

BIBLIOGRAPHIE

- ✓ Agulhon, C., Fiacco, T.A., and McCarthy, K.D. (2010). Hippocampal short- and long-term plasticity are not modulated by astrocyte Ca²⁺ signaling. *Science* 327, 1250–1254.
- ✓ Agulhon, C., Petravicz, J., McMullen, A.B., Sweger, E.J., Minton, S.K., Taves, S.R., Casper, K.B., Fiacco, T.A., and McCarthy, K.D. (2008). What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron* 59, 932–946.
- ✓ Alle, H., Roth, A., and Geiger, J.R.P. (2009). Energy-efficient action potentials in hippocampal mossy fibers. *Science* 325, 1405–1408.
- ✓ Allen, N.J., Rossi, D.J., and Attwell, D. (2004). Sequential release of GABA by exocytosis and reversed uptake leads to neuronal swelling in simulated ischemia of hippocampal slices. *J. Neurosci.* 24, 3837–3849.
- ✓ Amarenco, P., and Hauw, J.J. (1990). Cerebellar infarction in the territory of the superior cerebellar artery: a clinicopathologic study of 33 cases. *Neurology* 40, 1383–1390.
- ✓ Amiry-Moghaddam, M., and Ottersen, O.P. (2003). The molecular basis of water transport in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 991–1001.
- ✓ Amiry-Moghaddam, M., Frydenlund, D.S., and Ottersen, O.P. (2004). Anchoring of aquaporin-4 in brain: molecular mechanisms and implications for the physiology and pathophysiology of water transport. *Neuroscience* 129, 999–1010.
- ✓ Amzica, F., Massimini, M., and Manfridi, A. (2002). Spatial buffering during slow and paroxysmal sleep oscillations in cortical networks of glial cells in vivo. *J. Neurosci.* 22, 1042–1053.
- ✓ Anderson, T.R., Jarvis, C.R., Biedermann, A.J., Molnar, C., and Andrew, R.D. (2005). Blocking the anoxic depolarization protects without functional compromise following simulated stroke in cortical brain slices. *J. Neurophysiol.* 93, 963–979.
- ✓ Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H.R., Robitaille, R., and Volterra, A. (2014). Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81, 728–739.
- ✓ Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., and Haydon, P.G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208–215.
- ✓ Arbeloa, J., Pérez-Samartín, A., Gottlieb, M., and Matute, C. (2012). P2X7 receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in neurons and reduces brain damage after ischemia. *Neurobiol. Dis.* 45, 954–961.

- ✓ Ardeshiri, A., Kelley, M.H., Korner, I.P., Hurn, P.D., and Herson, P.S. (2006). Mechanism of progesterone neuroprotection of rat cerebellar Purkinje cells following oxygen-glucose deprivation. *Eur. J. Neurosci.* 24, 2567–2574.
- ✓ Attwell, D., Buchan, A.M., Charpak, S., Lauritzen, M., Macvicar, B.A., and Newman, E.A. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 468, 232–243.
- ✓ Bai, H.-Y., and Li, A.-P. (2013). P2X(7) receptors in cerebral ischemia. *Neurosci Bull* 29, 390–398.
- ✓ Balakrishnan, S., and Bellamy, T.C. (2009). Depression of parallel and climbing fiber transmission to Bergmann glia is input specific and correlates with increased precision of synaptic transmission. *Glia* 57, 393–401.
- ✓ Balakrishnan, S., Dobson, K.L., Jackson, C., and Bellamy, T.C. (2014). Ectopic release of glutamate contributes to spillover at parallel fibre synapses in the cerebellum. *J. Physiol. (Lond.)* 592, 1493–1503.
- ✓ Balakrishnan, S., Jackson, C., Russell, N., and Bellamy, T.C. (2011). Ectopic release sites lack fast vesicle recycling mechanisms, causing long-term depression of neuronal transmission in rat cerebellum. *Glia* 59, 82–93.
- ✓ Ballerini, P., Rathbone, M.P., Di Iorio, P., Renzetti, A., Giuliani, P., D'Alimonte, I., Trubiani, O., Caciagli, F., and Ciccarelli, R. (1996). Rat astroglial P2Z (P2X7) receptors regulate intracellular calcium and purine release. *Neuroreport* 7, 2533–2537.
- ✓ Barakat, L., and Bordey, A. (2002). GAT-1 and reversible GABA transport in Bergmann glia in slices. *J. Neurophysiol.* 88, 1407–1419.
- ✓ Baron, J.-C. (2009). [Stroke: update on therapy]. *Med Sci (Paris)* 25, 771–772.
- ✓ Barros, L.F., Courjaret, R., Jakoby, P., Loaiza, A., Lohr, C., and Deitmer, J.W. (2009). Preferential transport and metabolism of glucose in Bergmann glia over Purkinje cells: a multiphoton study of cerebellar slices. *Glia* 57, 962–970.
- ✓ Beierlein, M., and Regehr, W.G. (2006). Brief bursts of parallel fiber activity trigger calcium signals in bergmann glia. *J. Neurosci.* 26, 6958–6967.
- ✓ Béjot, Y., Touzé, E., Jacquin, A., Giroud, M., and Mas, J.-L. (2009). [Epidemiology of stroke]. *Med Sci (Paris)* 25, 727–732.
- ✓ Bélanger, M., Allaman, I., and Magistretti, P.J. (2011). Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab.* 14, 724–738.
- ✓ Bellamy, T.C. (2006). Interactions between Purkinje neurones and Bergmann glia. *Cerebellum* 5, 116–126.

- ✓ Bellamy, T.C., and Ogden, D. (2005). Short-term plasticity of Bergmann glial cell extrasynaptic currents during parallel fiber stimulation in rat cerebellum. *Glia* 52, 325–335.
- ✓ Bellamy, T.C., and Ogden, D. (2006). Long-term depression of neuron to glial signalling in rat cerebellar cortex. *Eur. J. Neurosci.* 23, 581–586.
- ✓ Ben Haim, L., Carrillo-de Sauvage, M.-A., Ceyzériat, K., and Escartin, C. (2015). Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci* 9, 278.
- ✓ Benakis, C., Garcia-Bonilla, L., Iadecola, C., and Anrather, J. (2014). The role of microglia and myeloid immune cells in acute cerebral ischemia. *Front Cell Neurosci* 8, 461.
- ✓ Benesova, J., Rusnakova, V., Honsa, P., Pivonkova, H., Dzamba, D., Kubista, M., and Anderova, M. (2012). Distinct expression/function of potassium and chloride channels contributes to the diverse volume regulation in cortical astrocytes of GFAP/EGFP mice. *PLoS ONE* 7, e29725.
- ✓ Benfenati, V., and Ferroni, S. (2010). Water transport between CNS compartments: functional and molecular interactions between aquaporins and ion channels. *Neuroscience* 168, 926–940.
- ✓ Benquet, P., Gee, C.E., and Gerber, U. (2008). [Transient brain ischemia: NMDA receptor modulation and delayed neuronal death]. *Med Sci (Paris)* 24, 185–190.
- ✓ Beppu, K., Sasaki, T., Tanaka, K.F., Yamanaka, A., Fukazawa, Y., Shigemoto, R., and Matsui, K. (2014). Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage. *Neuron* 81, 314–320.
- ✓ Bergami, M., Santi, S., Formaggio, E., Cagnoli, C., Verderio, C., Blum, R., Berninger, B., Matteoli, M., and Canossa, M. (2008). Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes. *J. Cell Biol.* 183, 213–221.
- ✓ Bergles, D.E., Dzubay, J.A., and Jahr, C.E. (1997). Glutamate transporter currents in bergmann glial cells follow the time course of extrasynaptic glutamate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 14821–14825.
- ✓ Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J.L., Seifert, G., Steinhäuser, C., Pilati, E., and Volterra, A. (2004). Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat. Neurosci.* 7, 613–620.
- ✓ Binder, D.K., Yao, X., Zador, Z., Sick, T.J., Verkman, A.S., and Manley, G.T. (2006). Increased seizure duration and slowed potassium kinetics in mice lacking aquaporin-4

water channels. *Glia* 53, 631–636.

- ✓ Blanz, J., Schweizer, M., Auberson, M., Maier, H., Muenscher, A., Hübner, C.A., and Jentsch, T.J. (2007). Leukoencephalopathy upon disruption of the chloride channel *ClC-2*. *J. Neurosci.* 27, 6581–6589.
- ✓ Bonde, C., Noraberg, J., Noer, H., and Zimmer, J. (2005). Ionotropic glutamate receptors and glutamate transporters are involved in necrotic neuronal cell death induced by oxygen-glucose deprivation of hippocampal slice cultures. *Neuroscience* 136, 779–794.
- ✓ Bonita, R., Duncan, J., Truelsen, T., Jackson, R.T., and Beaglehole, R. (1999). Passive smoking as well as active smoking increases the risk of acute stroke. *Tob Control* 8, 156–160.
- ✓ Bordet, R., Ouk, T., Onténiente, B., Charriaut-Marlangue, C., and Heurteaux, C. (2009). [Cerebral ischaemia: tomorrow's therapeutic tracks]. *Med Sci (Paris)* 25, 847–854.
- ✓ Bouleti, C., Mathivet, T., Lapergue, B., Monnot, C., and Germain, S. (2014). [Protection of vascular integrity in reperfusion during stroke]. *Med Sci (Paris)* 30, 608–610.
- ✓ Brady, J.D., Mohr, C., and Rossi, D.J. (2010). Vesicular GABA release delays the onset of the Purkinje cell terminal depolarization without affecting tissue swelling in cerebellar slices during simulated ischemia. *Neuroscience* 168, 108–117.
- ✓ Braeuninger, S., and Kleinschnitz, C. (2009). Rodent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Exp Transl Stroke Med* 1, 8.
- ✓ Broughton, B.R.S., Reutens, D.C., and Sobey, C.G. (2009). Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 40, e331–e339.
- ✓ Brouns, R., and De Deyn, P.P. (2009). The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg* 111, 483–495.
- ✓ Brown, A.M. (2004). Brain glycogen re-awakened. *J. Neurochem.* 89, 537–552.
- ✓ Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., and Ellisman, M.H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J. Neurosci.* 22, 183–192.
- ✓ Canazza, A., Minati, L., Boffano, C., Parati, E., and Binks, S. (2014). Experimental models of brain ischemia: a review of techniques, magnetic resonance imaging, and investigational cell-based therapies. *Front Neurol* 5, 19.
- ✓ Carmichael, S.T. (2005). Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and

purpose. *NeuroRx* 2, 396–409.

- ✓ Castejón, O.J., Dailey, M.E., Apkarian, R.P., and Castejón, H.V. (2002). Correlative microscopy of cerebellar Bergmann glial cells. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 34, 131–142.
- ✓ Cavelier, P., and Attwell, D. (2005). Tonic release of glutamate by a DIDS-sensitive mechanism in rat hippocampal slices. *J. Physiol. (Lond.)* 564, 397–410.
- ✓ Chan, P.H. (2001). Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 2–14.
- ✓ Chaumont, J., Guyon, N., Valera, A.M., Dugué, G.P., Popa, D., Marcaggi, P., Gautheron, V., Reibel-Foisset, S., Dieudonné, S., Stephan, A., et al. (2013). Clusters of cerebellar Purkinje cells control their afferent climbing fiber discharge. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 16223–16228.
- ✓ Chauvier, D., Ankri, S., Charriaut-Marlangue, C., Casimir, R., and Jacotot, E. (2007). Broad-spectrum caspase inhibitors: from myth to reality? *Cell Death Differ.* 14, 387–391.
- ✓ Chessell, I.P., Michel, A.D., and Humphrey, P.P. (1997). Properties of the pore-forming P2X7 purinoceptor in mouse NTW8 microglial cells. *Br. J. Pharmacol.* 121, 1429–1437.
- ✓ Chever, O., Djukic, B., McCarthy, K.D., and Amzica, F. (2010). Implication of Kir4.1 channel in excess potassium clearance: an in vivo study on anesthetized glial-conditional Kir4.1 knock-out mice. *J. Neurosci.* 30, 15769–15777.
- ✓ Chever, O., Pannasch, U., Ezan, P., and Rouach, N. (2014). Astroglial connexin 43 sustains glutamatergic synaptic efficacy. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 369, 20130596.
- ✓ Choi, D.W. (1987). Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 7, 369–379.
- ✓ Chuquet, J., Quilichini, P., Nimchinsky, E.A., and Buzsáki, G. (2010). Predominant enhancement of glucose uptake in astrocytes versus neurons during activation of the somatosensory cortex. *J. Neurosci.* 30, 15298–15303.
- ✓ Cimarosti, H., and Henley, J.M. (2008). Investigating the mechanisms underlying neuronal death in ischemia using in vitro oxygen-glucose deprivation: potential involvement of protein SUMOylation. *Neuroscientist* 14, 626–636.
- ✓ Clark, B.A., and Barbour, B. (1997). Currents evoked in Bergmann glial cells by parallel fibre stimulation in rat cerebellar slices. *J. Physiol. (Lond.)* 502 (Pt 2), 335–350.

- ✓ Clarke, L.E., and Barres, B.A. (2013). Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 311–321.
- ✓ Connors, B.W., and Long, M.A. (2004). Electrical synapses in the mammalian brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 393–418.
- ✓ D'hondt, C., Ponsaerts, R., De Smedt, H., Vinken, M., De Vuyst, E., De Bock, M., Wang, N., Rogiers, V., Leybaert, L., Himpens, B., et al. (2011). Pannexin channels in ATP release and beyond: an unexpected rendezvous at the endoplasmic reticulum. *Cell. Signal.* 23, 305–316.
- ✓ Davila, D., Thibault, K., Fiacco, T.A., and Agulhon, C. (2013). Recent molecular approaches to understanding astrocyte function in vivo. *Front Cell Neurosci* 7, 272.
- ✓ De Cristóbal, J., Moro, M.A., Dávalos, A., Castillo, J., Leza, J.C., Camarero, J., Colado, M.I., Lorenzo, P., and Lizasoain, I. (2001). Neuroprotective effect of aspirin by inhibition of glutamate release after permanent focal cerebral ischaemia in rats. *J. Neurochem.* 79, 456–459.
- ✓ De Zeeuw, C.I., and Hoogland, T.M. (2015). Reappraisal of Bergmann glial cells as modulators of cerebellar circuit function. *Front Cell Neurosci* 9, 246.
- ✓ Deitmer, J.W. (2000). Glial strategy for metabolic shuttling and neuronal function. *Bioessays* 22, 747–752.
- ✓ Deitmer JW. (2007) Acide-base transport and pH regulation. In: *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology. Vol 5: Brain Energetics. Integration of Molecular and Cellular Processes* (eds Gibson GE, Diener GA) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 469-486.
- ✓ Del Zoppo, G.J. (2009). Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 158, 972–982.
- ✓ Del Zoppo, G.J., and Hallenbeck, J.M. (2000). Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb. Res.* 98, 73–81.
- ✓ Demetrius, L.A., Magistretti, P.J., and Pellerin, L. (2014). Alzheimer's disease: the amyloid hypothesis and the Inverse Warburg effect. *Front Physiol* 5, 522.
- ✓ Deplanque D. (2003) Physiopathologie de l'ischémie cérébrale. *Encycl Méd Chir* (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Neurologie, 17-045-A-80, 2003, 10 p
- ✓ Di Castro, M.A., Chuquet, J., Liaudet, N., Bhaukaurally, K., Santello, M., Bouvier, D., Tiret, P., and Volterra, A. (2011). Local Ca²⁺ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nat. Neurosci.* 14, 1276–1284.

- ✓ Dirnagl, U., Iadecola, C., and Moskowitz, M.A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22, 391–397.
- ✓ Djukic, B., Casper, K.B., Philpot, B.D., Chin, L.-S., and McCarthy, K.D. (2007). Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation. *J. Neurosci.* 27, 11354–11365.
- ✓ Dong, Y., and Benveniste, E.N. (2001). Immune function of astrocytes. *Glia* 36, 180–190.
- ✓ Donnan, G.A., and Davis, S.M. (2002). Neuroimaging, the ischaemic penumbra, and selection of patients for acute stroke therapy. *Lancet Neurol* 1, 417–425.
- ✓ Donnan, G.A., Fisher, M., Macleod, M., and Davis, S.M. (2008). Stroke. *Lancet* 371, 1612–1623.
- ✓ Durukan, A., and Tatlisumak, T. (2007). Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 87, 179–197.
- ✓ Edlow, J.A., Newman-Toker, D.E., and Savitz, S.I. (2008). Diagnosis and initial management of cerebellar infarction. *Lancet Neurol* 7, 951–964.
- ✓ Emsley, J.G., and Macklis, J.D. (2006). Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biol.* 2, 175–186.
- ✓ Eulenburg, V., and Gomeza, J. (2010). Neurotransmitter transporters expressed in glial cells as regulators of synapse function. *Brain Res Rev* 63, 103–112.
- ✓ Evans, M.D., and Cooke, M.S. (2004). Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bioessays* 26, 533–542.
- ✓ Fellin, T., Pozzan, T., and Carmignoto, G. (2006). Purinergic receptors mediate two distinct glutamate release pathways in hippocampal astrocytes. *J. Biol. Chem.* 281, 4274–4284.
- ✓ Fiacco, T.A., Agulhon, C., Taves, S.R., Petravic, J., Casper, K.B., Dong, X., Chen, J., and McCarthy, K.D. (2007). Selective stimulation of astrocyte calcium in situ does not affect neuronal excitatory synaptic activity. *Neuron* 54, 611–626.
- ✓ Fields, R.D., and Burnstock, G. (2006). Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 423–436.
- ✓ Filosa, J.A., Morrison, H.W., Iddings, J.A., Du, W., and Kim, K.J. (2015). Beyond neurovascular coupling, role of astrocytes in the regulation of vascular tone. *Neuroscience*.

- ✓ Fisher, M., Feuerstein, G., Howells, D.W., Hurn, P.D., Kent, T.A., Savitz, S.I., Lo, E.H., and STAIR Group (2009). Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke* 40, 2244–2250.
- ✓ Fonnum, F., and Lock, E.A. (2000). Cerebellum as a target for toxic substances. *Toxicol. Lett.* 112-113, 9–16.
- ✓ Fort, P.E., Sene, A., Pannicke, T., Roux, M.J., Forster, V., Mornet, D., Nudel, U., Yaffe, D., Reichenbach, A., Sahel, J.A., et al. (2008). Kir4.1 and AQP4 associate with Dp71- and utrophin-DAPs complexes in specific and defined microdomains of Müller retinal glial cell membrane. *Glia* 56, 597–610.
- ✓ Frank, J.I. (1995). Large hemispheric infarction, deterioration, and intracranial pressure. *Neurology* 45, 1286–1290.
- ✓ Franke, H., Krügel, U., and Illes, P. (2006). P2 receptors and neuronal injury. *Pflugers Arch.* 452, 622–644.
- ✓ Gasche, Y., and Copin, J.-C. (2003). [Blood-brain barrier pathophysiology and ischaemic brain oedema]. *Ann Fr Anesth Reanim* 22, 312–319.
- ✓ Gee, C.E., Benquet, P., Raineteau, O., Rietschin, L., Kirbach, S.W., and Gerber, U. (2006). NMDA receptors and the differential ischemic vulnerability of hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 23, 2595–2603.
- ✓ Geiger, J.R., Melcher, T., Koh, D.S., Sakmann, B., Seeburg, P.H., Jonas, P., and Monyer, H. (1995). Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15, 193–204.
- ✓ Giaume, C., Kirchhoff, F., Matute, C., Reichenbach, A., and Verkhratsky, A. (2007). Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death Differ.* 14, 1324–1335.
- ✓ Giaume, C., Koulakoff, A., Roux, L., Holcman, D., and Rouach, N. (2010). Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 87–99.
- ✓ Gibor, G., Yakubovich, D., Peretz, A., and Attali, B. (2004). External barium affects the gating of KCNQ1 potassium channels and produces a pore block via two discrete sites. *J. Gen. Physiol.* 124, 83–102.
- ✓ Ginsberg, M.D. (2008). Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 55, 363–389.
- ✓ Goldstein, L.B., Bushnell, C.D., Adams, R.J., Appel, L.J., Braun, L.T., Chaturvedi, S., Creager, M.A., Culebras, A., Eckel, R.H., Hart, R.G., et al. (2011). Guidelines for the primary prevention of stroke: a guideline for healthcare professionals from the

American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 42, 517–584.

- ✓ Grewer, C., and Rauen, T. (2005). Electrogenic glutamate transporters in the CNS: molecular mechanism, pre-steady-state kinetics, and their impact on synaptic signaling. *J. Membr. Biol.* 203, 1–20.
- ✓ Grosche, J., Matyash, V., Möller, T., Verkhratsky, A., Reichenbach, A., and Kettenmann, H. (1999). Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat. Neurosci.* 2, 139–143.
- ✓ Habbas, S., Ango, F., Daniel, H., and Galante, M. (2011). Purinergic signaling in the cerebellum: Bergmann glial cells express functional ionotropic P2X7 receptors. *Glia* 59, 1800–1812.
- ✓ Haber, M., Zhou, L., and Murai, K.K. (2006). Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses. *J. Neurosci.* 26, 8881–8891.
- ✓ Hacke, W., Kaste, M., Bluhmki, E., Brozman, M., Dávalos, A., Guidetti, D., Larrue, V., Lees, K.R., Medeghri, Z., Machnig, T., et al. (2008). Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 359, 1317–1329.
- ✓ Hajek, I., Subbarao, K.V., and Hertz, L. (1996). Acute and chronic effects of potassium and noradrenaline on Na⁺, K⁺-ATPase activity in cultured mouse neurons and astrocytes. *Neurochem. Int.* 28, 335–342.
- ✓ Hakim, A.M., Evans, A.C., Berger, L., Kuwabara, H., Worsley, K., Marchal, G., Biel, C., Pokrupa, R., Diksic, M., and Meyer, E. (1989). The effect of nimodipine on the evolution of human cerebral infarction studied by PET. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 9, 523–534.
- ✓ Halassa, M.M., and Haydon, P.G. (2010). Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 335–355.
- ✓ Halassa, M.M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J.-H., and Haydon, P.G. (2007). Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J. Neurosci.* 27, 6473–6477.
- ✓ Hamann, M., Rossi, D.J., Mohr, C., Andrade, A.L., and Attwell, D. (2005). The electrical response of cerebellar Purkinje neurons to simulated ischaemia. *Brain* 128, 2408–2420.
- ✓ Hamilton, N.B., and Attwell, D. (2010). Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 227–238.
- ✓ Hassel, B., Paulsen, R.E., Johnsen, A., and Fonnum, F. (1992). Selective inhibition of glial cell metabolism in vivo by fluorocitrate. *Brain Res.* 576, 120–124.

- ✓ Heiss, W.-D. (2011). The ischemic penumbra: correlates in imaging and implications for treatment of ischemic stroke. The Johann Jacob Wepfer award 2011. *Cerebrovasc. Dis.* 32, 307–320.
- ✓ Heo, J.H., Han, S.W., and Lee, S.K. (2005). Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 51–70.
- ✓ Herculano-Houzel, S. (2014). The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia* 62, 1377–1391.
- ✓ Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., and Kurachi, Y. (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol. Rev.* 90, 291–366.
- ✓ Higashi, K., Fujita, A., Inanobe, A., Tanemoto, M., Doi, K., Kubo, T., and Kurachi, Y. (2001). An inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 281, C922–C931.
- ✓ Hille, B. (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes* (Mass.).
- ✓ Hirrlinger, J., Hülsmann, S., and Kirchhoff, F. (2004). Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminals in situ. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2235–2239.
- ✓ Hoogland, T.M., and Kuhn, B. (2010). Recent developments in the understanding of astrocyte function in the cerebellum in vivo. *Cerebellum* 9, 264–271.
- ✓ Hoogland, T.M., Kuhn, B., Göbel, W., Huang, W., Nakai, J., Helmchen, F., Flint, J., and Wang, S.S.-H. (2009). Radially expanding transglial calcium waves in the intact cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 3496–3501.
- ✓ Hossmann, K.A. (1994). Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann. Neurol.* 36, 557–565.
- ✓ Hounsgaard, J., and Nicholson, C. (1983). Potassium accumulation around individual purkinje cells in cerebellar slices from the guinea-pig. *J. Physiol. (Lond.)* 340, 359–388.
- ✓ Huang, Y., and McNamara, J.O. (2004). Ischemic stroke: “acidotoxicity” is a perpetrator. *Cell* 118, 665–666.
- ✓ Iino, M., Goto, K., Kakegawa, W., Okado, H., Sudo, M., Ishiuchi, S., Miwa, A., Takayasu, Y., Saito, I., Tsuzuki, K., et al. (2001). Glia-synapse interaction through Ca²⁺-permeable AMPA receptors in Bergmann glia. *Science* 292, 926–929.

- ✓ Ishrat, T., Soliman, S., Guan, W., Saler, M., and Fagan, S.C. (2012). Vascular protection to increase the safety of tissue plasminogen activator for stroke. *Curr. Pharm. Des.* 18, 3677–3684.
- ✓ Jakoby, P., Schmidt, E., Ruminot, I., Gutiérrez, R., Barros, L.F., and Deitmer, J.W. (2014). Higher transport and metabolism of glucose in astrocytes compared with neurons: a multiphoton study of hippocampal and cerebellar tissue slices. *Cereb. Cortex* 24, 222–231.
- ✓ Jarvis, C.R., Anderson, T.R., and Andrew, R.D. (2001). Anoxic depolarization mediates acute damage independent of glutamate in neocortical brain slices. *Cereb. Cortex* 11, 249–259.
- ✓ Jeworutzki, E., López-Hernández, T., Capdevila-Nortes, X., Sirisi, S., Bengtsson, L., Montolio, M., Zifarelli, G., Arnedo, T., Müller, C.S., Schulte, U., et al. (2012). GlialCAM, a protein defective in a leukodystrophy, serves as a ClC-2 Cl⁻ channel auxiliary subunit. *Neuron* 73, 951–961.
- ✓ Jolivet, R., Coggan, J.S., Allaman, I., and Magistretti, P.J. (2015). Multi-timescale modeling of activity-dependent metabolic coupling in the neuron-glia-vasculature ensemble. *PLoS Comput. Biol.* 11, e1004036.
- ✓ Joshi, I., and Andrew, R.D. (2001). Imaging anoxic depolarization during ischemia-like conditions in the mouse hemi-brain slice. *J. Neurophysiol.* 85, 414–424.
- ✓ Jourdain, P., Bergersen, L.H., Bhaukaurally, K., Bezzi, P., Santello, M., Domercq, M., Matute, C., Tonello, F., Gundersen, V., and Volterra, A. (2007). Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat. Neurosci.* 10, 331–339.
- ✓ Kahle, K.T., Simard, J.M., Staley, K.J., Nahed, B.V., Jones, P.S., and Sun, D. (2009). Molecular mechanisms of ischemic cerebral edema: role of electroneutral ion transport. *Physiology (Bethesda)* 24, 257–265.
- ✓ Kao, Y.-C.J., Li, W., Lai, H.-Y., Oyarzabal, E.A., Lin, W., and Shih, Y.-Y.I. (2014). Dynamic perfusion and diffusion MRI of cortical spreading depolarization in photothrombotic ischemia. *Neurobiol. Dis.* 71, 131–139.
- ✓ Kase, C.S., Norrving, B., Levine, S.R., Babikian, V.L., Chodosh, E.H., Wolf, P.A., and Welch, K.M. (1993). Cerebellar infarction. Clinical and anatomic observations in 66 cases. *Stroke* 24, 76–83.
- ✓ Kelley, M.H., Taguchi, N., Ardeshiri, A., Kuroiwa, M., Hurn, P.D., Traystman, R.J., and Herson, P.S. (2008). Ischemic insult to cerebellar Purkinje cells causes diminished GABAA receptor function and allopregnanolone neuroprotection is associated with GABAA receptor stabilization. *J. Neurochem.* 107, 668–678.

- ✓ Kelly, P.J., Stein, J., Shafqat, S., Eskey, C., Doherty, D., Chang, Y., Kurina, A., and Furie, K.L. (2001). Functional recovery after rehabilitation for cerebellar stroke. *Stroke* 32, 530–534.
- ✓ Kettenmann, H., and Ransom, B.R. (2005). *Neuroglia* (Oxford University Press, USA).
- ✓ Khakh, B.S., and Sofroniew, M.V. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat. Neurosci.* 18, 942–952.
- ✓ Kharlamov, A., Jones, S.C., and Kim, D.K. (2002). Suramin reduces infarct volume in a model of focal brain ischemia in rats. *Exp Brain Res* 147, 353–359.
- ✓ Kimelberg, H.K. (2004). The problem of astrocyte identity. *Neurochem. Int.* 45, 191–202.
- ✓ Kimelberg, H.K. (2005). Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy. *Glia* 50, 389–397.
- ✓ Kirischuk, S., Möller, T., Voitenko, N., Kettenmann, H., and Verkhratsky, A. (1995). ATP-induced cytoplasmic calcium mobilization in Bergmann glial cells. *J. Neurosci.* 15, 7861–7871.
- ✓ Kraig, R.P., Ferreira-Filho, C.R., and Nicholson, C. (1983). Alkaline and acid transients in cerebellar microenvironment. *J. Neurophysiol.* 49, 831–850.
- ✓ Kristián, T., and Siesjö, B.K. (1998). Calcium in ischemic cell death. *Stroke* 29, 705–718.
- ✓ Kulik, A., Haentzsch, A., Lückermann, M., Reichelt, W., and Ballanyi, K. (1999). Neuron-glia signaling via alpha(1) adrenoceptor-mediated Ca(2+) release in Bergmann glial cells in situ. *J. Neurosci.* 19, 8401–8408.
- ✓ Kunz, A., Dirnagl, U., and Mergenthaler, P. (2010). Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 24, 495–509.
- ✓ Lai, T.W., Zhang, S., and Wang, Y.T. (2014). Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* 115, 157–188.
- ✓ Lämmer, A., Günther, A., Beck, A., Krügel, U., Kittner, H., Schneider, D., Illes, P., and Franke, H. (2006). Neuroprotective effects of the P2 receptor antagonist PPADS on focal cerebral ischaemia-induced injury in rats. *Eur. J. Neurosci.* 23, 2824–2828.
- ✓ Lämmer, A.B., Beck, A., Grummich, B., Förschler, A., Krügel, T., Kahn, T., Schneider, D., Illes, P., Franke, H., and Krügel, U. (2011). The P2 receptor antagonist PPADS supports recovery from experimental stroke in vivo. *PLoS ONE* 6, e19983.

- ✓ Lehre, K.P., and Danbolt, N.C. (1998). The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J. Neurosci.* 18, 8751–8757.
- ✓ Leichsenring, A., Riedel, T., Qin, Y., Rubini, P., and Illes, P. (2013). Anoxic depolarization of hippocampal astrocytes: possible modulation by P2X7 receptors. *Neurochem. Int.* 62, 15–22.
- ✓ Leis, J.A., Bekar, L.K., and Walz, W. (2005). Potassium homeostasis in the ischemic brain. *Glia* 50, 407–416.
- ✓ Lewington, S., Clarke, R., Qizilbash, N., Peto, R., Collins, R., and Prospective Studies Collaboration (2002). Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 360, 1903–1913.
- ✓ Leys, D., Béjot, Y., Debette, S., and Giroud, M. (2008). Burden of stroke in France. *Int J Stroke* 3, 117–119.
- ✓ Li, D., Agulhon, C., Schmidt, E., Oheim, M., and Ropert, N. (2013). New tools for investigating astrocyte-to-neuron communication. *Front Cell Neurosci* 7, 193.
- ✓ Liang, D., Bhatta, S., Gerzanich, V., and Simard, J.M. (2007). Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. *Neurosurg Focus* 22, E2.
- ✓ Lin, M.-C., Huang, Y.-L., Liu, H.-W., Yang, D.-Y., Lee, C.-P., Yang, L.-L., and Cheng, F.-C. (2004). On-line microdialysis-graphite furnace atomic absorption spectrometry in the determination of brain magnesium levels in gerbils subjected to cerebral ischemia/reperfusion. *J Am Coll Nutr* 23, 561S – 565S.
- ✓ Liu, H.-T., Akita, T., Shimizu, T., Sabirov, R.Z., and Okada, Y. (2009). Bradykinin-induced astrocyte-neuron signalling: glutamate release is mediated by ROS-activated volume-sensitive outwardly rectifying anion channels. *J. Physiol. (Lond.)* 587, 2197–2209.
- ✓ Love, S. (2003). Apoptosis and brain ischaemia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27, 267–282.
- ✓ Lundgaard, I., Li, B., Xie, L., Kang, H., Sanggaard, S., Haswell, J.D.R., Sun, W., Goldman, S., Blekot, S., Nielsen, M., et al. (2015). Direct neuronal glucose uptake heralds activity-dependent increases in cerebral metabolism. *Nat Commun* 6, 6807.
- ✓ Macaulay, N., and Zeuthen, T. (2012). Glial K⁺ clearance and cell swelling: key roles for cotransporters and pumps. *Neurochem. Res.* 37, 2299–2309.
- ✓ MacAulay, N., Hamann, S., and Zeuthen, T. (2004). Water transport in the brain: role of cotransporters. *Neuroscience* 129, 1031–1044.

- ✓ MacVicar, B.A., and Newman, E.A. (2015). Astrocyte regulation of blood flow in the brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7.
- ✓ MacVicar, B.A., and Thompson, R.J. (2010). Non-junction functions of pannexin-1 channels. *Trends Neurosci.* 33, 93–102.
- ✓ Magistretti, P.J., and Allaman, I. (2015). A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. *Neuron* 86, 883–901.
- ✓ Manley, G.T., Fujimura, M., Ma, T., Noshita, N., Filiz, F., Bollen, A.W., Chan, P., and Verkman, A.S. (2000). Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat. Med.* 6, 159–163.
- ✓ Maragakis, N.J., and Rothstein, J.D. (2006). Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2, 679–689.
- ✓ Marcaggi, P., Billups, D., and Attwell, D. (2003). The role of glial glutamate transporters in maintaining the independent operation of juvenile mouse cerebellar parallel fibre synapses. *J. Physiol. (Lond.)* 552, 89–107.
- ✓ Martin, L.J., Sieber, F.E., and Traystman, R.J. (2000). Apoptosis and necrosis occur in separate neuronal populations in hippocampus and cerebellum after ischemia and are associated with differential alterations in metabotropic glutamate receptor signaling pathways. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 153–167.
- ✓ Martineau, M. (2013). Gliotransmission: focus on exocytotic release of L-glutamate and D-serine from astrocytes. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1557–1561.
- ✓ Mathiesen, C., Brazhe, A., Thomsen, K., and Lauritzen, M. (2013). Spontaneous calcium waves in Bergman glia increase with age and hypoxia and may reduce tissue oxygen. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 161–169.
- ✓ Matsui, K., and Jahr, C.E. (2004). Differential control of synaptic and ectopic vesicular release of glutamate. *J. Neurosci.* 24, 8932–8939.
- ✓ Matsui, K., and Jahr, C.E. (2006). Exocytosis unbound. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 305–311.
- ✓ Matyash, V., and Kettenmann, H. (2010). Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev* 63, 2–10.
- ✓ McColl, B.W., Carswell, H.V., McCulloch, J., and Horsburgh, K. (2004). Extension of cerebral hypoperfusion and ischaemic pathology beyond MCA territory after intraluminal filament occlusion in C57Bl/6J mice. *Brain Res.* 997, 15–23.
- ✓ Melani, A., Corti, F., Stephan, H., Müller, C.E., Donati, C., Bruni, P., Vannucchi, M.G., and Pedata, F. (2012). Ecto-ATPase inhibition: ATP and adenosine release

under physiological and ischemic in vivo conditions in the rat striatum. *Exp. Neurol.* 233, 193–204.

- ✓ Mergenthaler, P., and Meisel, A. (2012). Do stroke models model stroke? *Dis Model Mech* 5, 718–725.
- ✓ Metea, M.R., Kofuji, P., and Newman, E.A. (2007). Neurovascular coupling is not mediated by potassium siphoning from glial cells. *J. Neurosci.* 27, 2468–2471.
- ✓ Mohan, K.M., Wolfe, C.D.A., Rudd, A.G., Heuschmann, P.U., Kolominsky-Rabas, P.L., and Grieve, A.P. (2011). Risk and cumulative risk of stroke recurrence: a systematic review and meta-analysis. *Stroke* 42, 1489–1494.
- ✓ Mohr, C., Brady, J.D., and Rossi, D.J. (2010). Young age and low temperature, but not female gender delay ATP loss and glutamate release, and protect Purkinje cells during simulated ischemia in cerebellar slices. *Neuropharmacology* 58, 392–403.
- ✓ Mothet, J.P., Parent, A.T., Wolosker, H., Brady, R.O., Linden, D.J., Ferris, C.D., Rogawski, M.A., and Snyder, S.H. (2000). D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 4926–4931.
- ✓ Müller, T., Fritschy, J.M., Grosche, J., Pratt, G.D., Möhler, H., and Kettenmann, H. (1994). Developmental regulation of voltage-gated K⁺ channel and GABA_A receptor expression in Bergmann glial cells. *J. Neurosci.* 14, 2503–2514.
- ✓ Müller, T., Möller, T., Berger, T., Schnitzer, J., and Kettenmann, H. (1992). Calcium entry through kainate receptors and resulting potassium-channel blockade in Bergmann glial cells. *Science* 256, 1563–1566.
- ✓ Müller, T., Möller, T., Neuhaus, J., and Kettenmann, H. (1996). Electrical coupling among Bergmann glial cells and its modulation by glutamate receptor activation. *Glia* 17, 274–284.
- ✓ Murphy-Royal, C., Dupuis, J.P., Varela, J.A., Panatier, A., Pinson, B., Baufreton, J., Groc, L., and Oliet, S.H.R. (2015). Surface diffusion of astrocytic glutamate transporters shapes synaptic transmission. *Nat. Neurosci.* 18, 219–226.
- ✓ Navarrete, M., Perea, G., Fernandez de Sevilla, D., Gómez-Gonzalo, M., Núñez, A., Martín, E.D., and Araque, A. (2012). Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biol.* 10, e1001259.
- ✓ Nedergaard, M., and Dirnagl, U. (2005). Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia* 50, 281–286.
- ✓ Nedergaard, M., and Verkhratsky, A. (2012). Artifact versus reality--how astrocytes contribute to synaptic events. *Glia* 60, 1013–1023.

- ✓ Nedergaard, M., Rodríguez, J.J., and Verkhratsky, A. (2010). Glial calcium and diseases of the nervous system. *Cell Calcium* 47, 140–149.
- ✓ Nicchia, G.P., Rossi, A., Nudel, U., Svelto, M., and Frigeri, A. (2008). Dystrophin-dependent and -independent AQP4 pools are expressed in the mouse brain. *Glia* 56, 869–876.
- ✓ Nicholls, D., and Attwell, D. (1990). The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 462–468.
- ✓ Nimmerjahn, A., Mukamel, E.A., and Schnitzer, M.J. (2009). Motor behavior activates Bergmann glial networks. *Neuron* 62, 400–412.
- ✓ Noh, K.-M., Yokota, H., Mashiko, T., Castillo, P.E., Zukin, R.S., and Bennett, M.V.L. (2005). Blockade of calcium-permeable AMPA receptors protects hippocampal neurons against global ischemia-induced death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 12230–12235.
- ✓ North, R.A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 82, 1013–1067.
- ✓ Ntaios, G., Dziedzic, T., Michel, P., Papavasileiou, V., Petersson, J., Staykov, D., Thomas, B., Steiner, T., and European Stroke Organisation (2015). European Stroke Organisation (ESO) guidelines for the management of temperature in patients with acute ischemic stroke. *Int J Stroke* 10, 941–949.
- ✓ Oliet, S.H.R., Panatier, A., and Piet, R. (2006). Functional neuronal-glia anatomical remodelling in the hypothalamus. *Novartis Found. Symp.* 276, 238–248; discussion 248–252, 275–281.
- ✓ Olsen, M.L., and Sontheimer, H. (2008). Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: from K⁺ buffering to cell differentiation. *J. Neurochem.* 107, 589–601.
- ✓ Paciaroni, M., Caso, V., and Agnelli, G. (2009). The concept of ischemic penumbra in acute stroke and therapeutic opportunities. *Eur. Neurol.* 61, 321–330.
- ✓ Pannasch, U., Vargová, L., Reingruber, J., Ezan, P., Holcman, D., Giaume, C., Syková, E., and Rouach, N. (2011). Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 8467–8472.
- ✓ Patel, A.B., Lai, J.C.K., Chowdhury, G.M.I., Hyder, F., Rothman, D.L., Shulman, R.G., and Behar, K.L. (2014). Direct evidence for activity-dependent glucose phosphorylation in neurons with implications for the astrocyte-to-neuron lactate shuttle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 5385–5390.
- ✓ Paukert, M., Agarwal, A., Cha, J., Doze, V.A., Kang, J.U., and Bergles, D.E. (2014).

Norepinephrine controls astroglial responsiveness to local circuit activity. *Neuron* 82, 1263–1270.

- ✓ Pellegrini-Giampietro, D.E., Gorter, J.A., Bennett, M.V., and Zukin, R.S. (1997). The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca²⁺-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci.* 20, 464–470.
- ✓ Pellegrini-Giampietro, D.E., Zukin, R.S., Bennett, M.V., Cho, S., and Pulsinelli, W.A. (1992). Switch in glutamate receptor subunit gene expression in CA1 subfield of hippocampus following global ischemia in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 10499–10503.
- ✓ Perronnet, C., and Vaillend, C. (2010). Dystrophins, utrophins, and associated scaffolding complexes: role in mammalian brain and implications for therapeutic strategies. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 849426.
- ✓ Petzold, G.C., and Murthy, V.N. (2011). Role of astrocytes in neurovascular coupling. *Neuron* 71, 782–797.
- ✓ Piet, R., and Jahr, C.E. (2007). Glutamatergic and purinergic receptor-mediated calcium transients in Bergmann glial cells. *J. Neurosci.* 27, 4027–4035.
- ✓ Pinoit, J.-M., Bejot, Y., Rouaud, O., Benatru, I., Osseby, G.-V., Bonin, B., Gisselmann, A., and Giroud, M. (2006). [Post-stroke depression, another handicap]. *Presse Med* 35, 1789–1793.
- ✓ Pocock, J.M., and Nicholls, D.G. (1998). Exocytotic and nonexocytotic modes of glutamate release from cultured cerebellar granule cells during chemical ischaemia. *J. Neurochem.* 70, 806–813.
- ✓ Poopalasundaram, S., Knott, C., Shamotienko, O.G., Foran, P.G., Dolly, J.O., Ghiani, C.A., Gallo, V., and Wilkin, G.P. (2000). Glial heterogeneity in expression of the inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, in adult rat CNS. *Glia* 30, 362–372.
- ✓ Pradeep, H., Diya, J.B., Shashikumar, S., and Rajanikant, G.K. (2012). Oxidative stress--assassin behind the ischemic stroke. *Folia Neuropathol* 50, 219–230.
- ✓ Quaegebeur, A., Lange, C., and Carmeliet, P. (2011). The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neuron* 71, 406–424.
- ✓ Rami, A., Bechmann, I., and Stehle, J.H. (2008). Exploiting endogenous anti-apoptotic proteins for novel therapeutic strategies in cerebral ischemia. *Prog. Neurobiol.* 85, 273–296.
- ✓ Reichenbach, A., Siegel, A., Rickmann, M., Wolff, J.R., Noone, D., and Robinson, S.R. (1995). Distribution of Bergmann glial somata and processes: implications for

function. *J Hirnforsch* 36, 509–517.

- ✓ Reyes, R.C., and Parpura, V. (2009). The trinity of Ca²⁺ sources for the exocytotic glutamate release from astrocytes. *Neurochem. Int.* 55, 2–8.
- ✓ Riquelme, R., Miralles, C.P., and De Blas, A.L. (2002). Bergmann glia GABA(A) receptors concentrate on the glial processes that wrap inhibitory synapses. *J. Neurosci.* 22, 10720–10730.
- ✓ Rivera, S., Jourquin, J., Ogier, C., Bernard, A., Charton, G., Tremblay, E., and Khrestchatisky, M. (2004). [The MMP/TIMP system in the nervous system]. *Med Sci (Paris)* 20, 55–60.
- ✓ Romero, M.F., Chen, A.-P., Parker, M.D., and Boron, W.F. (2013). The SLC4 family of bicarbonate (HCO₃⁻) transporters. *Mol. Aspects Med.* 34, 159–182.
- ✓ Romero, M.F., Fulton, C.M., and Boron, W.F. (2004). The SLC4 family of HCO₃⁻ transporters. *Pflugers Arch.* 447, 495–509.
- ✓ Rossi, D. (2015). Astrocyte physiopathology: At the crossroads of intercellular networking, inflammation and cell death. *Prog. Neurobiol.* 130, 86–120.
- ✓ Rossi, D.J., Brady, J.D., and Mohr, C. (2007). Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat. Neurosci.* 10, 1377–1386.
- ✓ Rossi, D.J., Oshima, T., and Attwell, D. (2000). Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403, 316–321.
- ✓ Rostain, J.C., and Balon, N. (2006). Recent neurochemical basis of inert gas narcosis and pressure effects. *Undersea Hyperb Med* 33, 197–204.
- ✓ Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., and Kuncl, R.W. (1994). Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13, 713–725.
- ✓ Rothwell, P.M., Coull, A.J., Silver, L.E., Fairhead, J.F., Giles, M.F., Lovelock, C.E., Redgrave, J.N.E., Bull, L.M., Welch, S.J.V., Cuthbertson, F.C., et al. (2005). Population-based study of event-rate, incidence, case fatality, and mortality for all acute vascular events in all arterial territories (Oxford Vascular Study). *Lancet* 366, 1773–1783.
- ✓ Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K., and Giaume, C. (2008). Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* 322, 1551–1555.
- ✓ Rungta, R.L., Choi, H.B., Tyson, J.R., Malik, A., Dissing-Olesen, L., Lin, P.J.C., Cain, S.M., Cullis, P.R., Snutch, T.P., and MacVicar, B.A. (2015). The cellular

mechanisms of neuronal swelling underlying cytotoxic edema. *Cell* 161, 610–621.

- ✓ Saab, A.S., Neumeier, A., Jahn, H.M., Cupido, A., Šimek, A.A.M., Boele, H.-J., Scheller, A., Le Meur, K., Götz, M., Monyer, H., et al. (2012). Bergmann glial AMPA receptors are required for fine motor coordination. *Science* 337, 749–753.
- ✓ Saigal, S., Sharma, J.P., Dhurwe, R., Kumar, S., and Gurjar, M. (2015). Targeted temperature management: Current evidence and practices in critical care. *Indian J Crit Care Med* 19, 537–546.
- ✓ Sasaki, T., Beppu, K., Tanaka, K.F., Fukazawa, Y., Shigemoto, R., and Matsui, K. (2012). Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 20720–20725.
- ✓ Schaller, B., and Graf, R. (2004). Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 24, 351–371.
- ✓ Schitine, C., Nogaroli, L., Costa, M.R., and Hedin-Pereira, C. (2015). Astrocyte heterogeneity in the brain: from development to disease. *Front Cell Neurosci* 9, 76.
- ✓ Shigetomi, E., Jackson-Weaver, O., Huckstepp, R.T., O’Dell, T.J., and Khakh, B.S. (2013). TRPA1 channels are regulators of astrocyte basal calcium levels and long-term potentiation via constitutive D-serine release. *J. Neurosci.* 33, 10143–10153.
- ✓ Silver, I.A., Deas, J., and Erecińska, M. (1997). Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells. *Neuroscience* 78, 589–601.
- ✓ Simard, M., and Nedergaard, M. (2004). The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129, 877–896.
- ✓ Singaravelu, K., Lohr, C., and Deitmer, J.W. (2006). Regulation of store-operated calcium entry by calcium-independent phospholipase A2 in rat cerebellar astrocytes. *J. Neurosci.* 26, 9579–9592.
- ✓ Sloan, S.A., and Barres, B.A. (2014). Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders. *Curr. Opin. Neurobiol.* 27, 75–81.
- ✓ Song, Y., and Gunnarson, E. (2012). Potassium dependent regulation of astrocyte water permeability is mediated by cAMP signaling. *PLoS ONE* 7, e34936.
- ✓ Sontheimer, H. (1992). Astrocytes, as well as neurons, express a diversity of ion channels. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70 Suppl, S223–S238.
- ✓ Stegmayr, B., and Asplund, K. (1995). Diabetes as a risk factor for stroke. A population perspective. *Diabetologia* 38, 1061–1068.

- ✓ Strohschein, S., Hüttmann, K., Gabriel, S., Binder, D.K., Heinemann, U., and Steinhäuser, C. (2011). Impact of aquaporin-4 channels on K⁺ buffering and gap junction coupling in the hippocampus. *Glia* 59, 973–980.
- ✓ Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR) (1999). Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 30, 2752–2758.
- ✓ Strong, K., Mathers, C., and Bonita, R. (2007). Preventing stroke: saving lives around the world. *Lancet Neurol* 6, 182–187.
- ✓ Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R.A., and Buell, G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272, 735–738.
- ✓ Sutherland, B.A., Minnerup, J., Balami, J.S., Arba, F., Buchan, A.M., and Kleinschnitz, C. (2012). Neuroprotection for ischaemic stroke: translation from the bench to the bedside. *Int J Stroke* 7, 407–418.
- ✓ Tait, M.J., Saadoun, S., Bell, B.A., and Papadopoulos, M.C. (2008). Water movements in the brain: role of aquaporins. *Trends Neurosci.* 31, 37–43.
- ✓ Takata, N., Mishima, T., Hisatsune, C., Nagai, T., Ebisui, E., Mikoshiba, K., and Hirase, H. (2011). Astrocyte calcium signaling transforms cholinergic modulation to cortical plasticity in vivo. *J. Neurosci.* 31, 18155–18165.
- ✓ Takatsuru, Y., Takayasu, Y., Iino, M., Nikkuni, O., Ueda, Y., Tanaka, K., and Ozawa, S. (2006). Roles of glial glutamate transporters in shaping EPSCs at the climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neurosci. Res.* 54, 140–148.
- ✓ Takayasu, Y., Iino, M., Kakegawa, W., Maeno, H., Watase, K., Wada, K., Yanagihara, D., Miyazaki, T., Komine, O., Watanabe, M., et al. (2005). Differential roles of glial and neuronal glutamate transporters in Purkinje cell synapses. *J. Neurosci.* 25, 8788–8793.
- ✓ Takayasu, Y., Iino, M., Shimamoto, K., Tanaka, K., and Ozawa, S. (2006). Glial glutamate transporters maintain one-to-one relationship at the climbing fiber-Purkinje cell synapse by preventing glutamate spillover. *J. Neurosci.* 26, 6563–6572.
- ✓ Tanaka, M., Yamaguchi, K., Tatsukawa, T., Nishioka, C., Nishiyama, H., Theis, M., Willecke, K., and Itohara, S. (2008a). Lack of Connexin43-mediated bergmann glial gap junctional coupling does not affect cerebellar long-term depression, motor coordination, or eyeblink conditioning. *Front Behav Neurosci* 2, 1.
- ✓ Tanaka, M., Yamaguchi, K., Tatsukawa, T., Theis, M., Willecke, K., and Itohara, S. (2008b). Connexin43 and bergmann glial gap junctions in cerebellar function. *Front*

Neurosci 2, 225–233.

- ✓ Tauskela, J.S., Mealing, G., Comas, T., Brunette, E., Monette, R., Small, D.L., and Morley, P. (2003). Protection of cortical neurons against oxygen-glucose deprivation and N-methyl-D-aspartate by DIDS and SITS. *Eur. J. Pharmacol.* 464, 17–25.
- ✓ Theodosis, D.T., Poulain, D.A., and Oliet, S.H.R. (2008). Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol. Rev.* 88, 983–1008.
- ✓ Thompson, R.J., and Macvicar, B.A. (2008). Connexin and pannexin hemichannels of neurons and astrocytes. *Channels (Austin)* 2, 81–86.
- ✓ Tong, X., Ao, Y., Faas, G.C., Nwaobi, S.E., Xu, J., Hausteiner, M.D., Anderson, M.A., Mody, I., Olsen, M.L., Sofroniew, M.V., et al. (2014). Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington’s disease model mice. *Nat. Neurosci.* 17, 694–703.
- ✓ Tzingounis, A.V., and Wadiche, J.I. (2007). Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 935–947.
- ✓ Unterberg, A.W., Stover, J., Kress, B., and Kiening, K.L. (2004). Edema and brain trauma. *Neuroscience* 129, 1021–1029.
- ✓ Vance, K.M., Rogers, R.C., and Hermann, G.E. (2015). PAR1-activated astrocytes in the nucleus of the solitary tract stimulate adjacent neurons via NMDA receptors. *J. Neurosci.* 35, 776–785.
- ✓ Verkhratsky, A., and Butt, A.M. (2007). *Glial Neurobiology* (John Wiley & Sons).
- ✓ Vlassenko, A.G., Rundle, M.M., Raichle, M.E., and Mintun, M.A. (2006). Regulation of blood flow in activated human brain by cytosolic NADH/NAD⁺ ratio. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 1964–1969.
- ✓ Volterra, A., Liaudet, N., and Savtchouk, I. (2014). Astrocyte Ca²⁺ signalling: an unexpected complexity. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 327–335.
- ✓ Walz, W. (2000). Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem. Int.* 36, 291–300.
- ✓ Wang, F., Smith, N.A., Xu, Q., Fujita, T., Baba, A., Matsuda, T., Takano, T., Bekar, L., and Nedergaard, M. (2012a). Astrocytes modulate neural network activity by Ca²⁺-dependent uptake of extracellular K⁺. *Sci Signal* 5, ra26.
- ✓ Wang, F., Xu, Q., Wang, W., Takano, T., and Nedergaard, M. (2012b). Bergmann glia modulate cerebellar Purkinje cell bistability via Ca²⁺-dependent K⁺ uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 7911–7916.

- ✓ Wang, Q., Tang, X.N., and Yenari, M.A. (2007). The inflammatory response in stroke. *J. Neuroimmunol.* 184, 53–68.
- ✓ Warlow, C., Sudlow, C., Dennis, M., Wardlaw, J., and Sandercock, P. (2003). Stroke. *Lancet* 362, 1211–1224.
- ✓ Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., and Couraud, P.-O. (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 842–857.
- ✓ White, H., Boden-Albala, B., Wang, C., Elkind, M.S.V., Rundek, T., Wright, C.B., and Sacco, R.L. (2005). Ischemic stroke subtype incidence among whites, blacks, and Hispanics: the Northern Manhattan Study. *Circulation* 111, 1327–1331.
- ✓ Won, S.J., Kim, D.Y., and Gwag, B.J. (2002). Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35, 67–86.
- ✓ Wulff, H. (2008). New light on the “old” chloride channel blocker DIDS. *ACS Chem. Biol.* 3, 399–401.
- ✓ Wyss, M.T., Jolivet, R., Buck, A., Magistretti, P.J., and Weber, B. (2011). In vivo evidence for lactate as a neuronal energy source. *J. Neurosci.* 31, 7477–7485.
- ✓ Xie, M., Wang, W., Kimelberg, H.K., and Zhou, M. (2008). Oxygen and glucose deprivation-induced changes in astrocyte membrane potential and their underlying mechanisms in acute rat hippocampal slices. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 456–467.
- ✓ Xu-Friedman, M.A., Harris, K.M., and Regehr, W.G. (2001). Three-dimensional comparison of ultrastructural characteristics at depressing and facilitating synapses onto cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 21, 6666–6672.
- ✓ Yang, Y., Ge, W., Chen, Y., Zhang, Z., Shen, W., Wu, C., Poo, M., and Duan, S. (2003). Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 15194–15199.
- ✓ Yao, X., Derugin, N., Manley, G.T., and Verkman, A.S. (2015). Reduced brain edema and infarct volume in aquaporin-4 deficient mice after transient focal cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.* 584, 368–372.
- ✓ Ye, Z.-C., Oberheim, N., Kettenmann, H., and Ransom, B.R. (2009). Pharmacological “cross-inhibition” of connexin hemichannels and swelling activated anion channels. *Glia* 57, 258–269.
- ✓ Zappalà, A., Cicero, D., Serapide, M.F., Paz, C., Catania, M.V., Falchi, M., Parenti, R., Pantò, M.R., La Delia, F., and Cicirata, F. (2006). Expression of pannexin1 in the CNS of adult mouse: cellular localization and effect of 4-aminopyridine-induced

seizures. *Neuroscience* 141, 167–178.

- ✓ Zhang, Y., and Barres, B.A. (2010). Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20, 588–594.
- ✓ Zhou, M., Xu, G., Xie, M., Zhang, X., Schools, G.P., Ma, L., Kimelberg, H.K., and Chen, H. (2009). TWIK-1 and TREK-1 are potassium channels contributing significantly to astrocyte passive conductance in rat hippocampal slices. *J. Neurosci.* 29, 8551–8564.

Titre : Impact d'un épisode ischémique sur la glie de Bergmann

Mots clés : Ischémie, Cervelet, Glie de Bergmann, électrophysiologie

Résumé : L'ischémie cérébrale est caractérisée par une interruption totale ou partielle de l'apport sanguin au cerveau, conduisant à une privation d'oxygène et de glucose pour les cellules du cerveau. Les processus cellulaires qui sont déclenchés par une ischémie cérébrale sont nombreux et complexes. La réduction sévère d'oxygène et de glucose entraîne la diminution de la production d'ATP et un changement drastique de la concentration de K^+ , du pH intracellulaire et extracellulaire et de la production de lactate. La perturbation du métabolisme énergétique au sein des tissus ischémiés conduit rapidement à la dépolarisation membranaire et au relargage de neurotransmetteurs dans le milieu extracellulaire. Dans le cervelet, l'impact d'un stress ischémique a largement été étudié sur les cellules de Purkinje, seule voie de sortie neuronale du cortex cérébelleux. Il a été montré que le glutamate, libéré par une surexcitation des fibres glutamatergiques et par l'inversion des transporteurs du glutamate, est la cause principale de la dépolarisation anoxique des cellules de Purkinje. Cependant, la compréhension de la réponse astrocytaire et l'influence des astrocytes vis-à-vis de l'ischémie ne sont pas encore connues. La cellule de Bergmann est un astrocyte radiaire qui compose un réseau de cellules couplées électriquement, formant des interactions anatomiques et fonctionnelles complexes avec les neurones du cortex cérébelleux. En utilisant un modèle *in vitro* d'ischémie cérébrale, la privation d'oxygène et de glucose (OGD), plusieurs caractéristiques de base de la réaction astrocytaire à l'ischémie sont analysées. Des expériences en patch clamp et imagerie calcique sont réalisées sur tranches de cervelet adulte révélant la réponse de la glie de Bergmann à l'OGD par une dépolarisation progressive de la membrane, avec en parallèle une augmentation de calcium cytosolique soutenue. L'enregistrement apparié entre cellule de Purkinje et cellule de Bergmann révèle des différences importantes de réponse à l'OGD entre ces deux types cellulaires. De plus, nous avons mesuré les changements de la concentration de K^+ extracellulaire durant l'OGD en utilisant des microélectrodes sensibles aux ions. Ceci nous a permis de mettre en évidence une corrélation importante entre la dynamique du K^+ extracellulaire et la dépolarisation membranaire de la cellule de Bergmann au cours de l'OGD. Ce travail montre que l'augmentation de K^+ et d'ATP dans l'espace extracellulaire, est à la base de la réponse de la glie de Bergmann à l'OGD. Dans le cervelet, alors, l'impact d'un épisode de privation d'oxygène et de glucose sur la glie de Bergmann suit des règles bien différentes par rapport aux neurones.

Title : Impact of ischemia on Bergmann Glia

Keywords : Ischemia, Cerebellum, Bergmann Glia, electrophysiology

Abstract : Cerebral ischemia is characterized by partial or total interruption of the blood supply to the brain resulting in glucose and oxygen deprivation to brain cells. The series of cellular processes that are unleashed by cerebral ischemia are complex. The severe reduction in oxygen and glucose induces decreases in ATP production and dramatic changes in extracellular K^+ concentration, pH of intracellular and extracellular space and lactate production. The disruption of energy metabolism in the ischemic tissue rapidly leads to membrane depolarization and neurotransmitters are released into the extracellular space. In the cerebellum, the impact of an ischemic stress has been extensively studied in Purkinje cells, the only neuronal output of the cerebellar cortex. It has been shown that glutamate released from overexcited fibers and from reversal of glutamate transporters, is the principal cause of the dramatic, anoxic depolarization in Purkinje cells. However, a detailed understanding of the astrocytic response to cerebellar ischemia and the potential influence of astrocytes to ischemia outcome is still lacking. Bergmann glia (BG) are radial glial cells that form networks of electrically coupled cells underlying complex anatomical and functional interactions with the neurons of the cerebellar cortex. Using an *in vitro* model of cerebral ischemia, the oxygen and glucose deprivation (OGD), several basic features of astrocytic reaction to ischemia are analyzed. Patch clamp and calcium imaging experiments performed in cerebellar slices from adult mice revealed that BG respond to OGD with a progressive membrane depolarization that is paralleled with a sustained cytosolic calcium increase. Double patch-clamp recordings between Purkinje neurons and BG reveal different responses to OGD in these cell types. Furthermore, we measured extracellular potassium concentration changes during OGD by using ion-sensitive microelectrodes and we found an important correlation between the BG membrane depolarization and the extracellular K^+ dynamics during OGD. Our results thus suggest that increases of K^+ and ATP concentrations in the extracellular space are primordial mediators of the cellular depolarizations of Bergmann glial cells following OGD onset. In the cerebellum, glial responses to energy deprivation-triggering events are therefore highly likely to follow largely distinct rules from those of their neuronal counterparts.