

Impact du peptide amyloïde β sur la signalisation calcique astrocytaire et les interactions neurone-glie Anthony Bosson

▶ To cite this version:

Anthony Bosson. Impact du peptide amyloïde β sur la signalisation calcique astrocytaire et les interactions neurone-glie. Neurobiologie. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT: 2016GREAV029. tel-01556489

HAL Id: tel-01556489 https://theses.hal.science/tel-01556489

Submitted on 5 Jul 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.

Communauté UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Neurosciences Neurobiologie** Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Anthony BOSSON

Thèse dirigée par Mireille Albrieux

préparée au sein du **Grenoble Institut des Neurosciences** U1216 équipe Neuropathologies et dysfonctions synaptiques dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Impact du peptide amyloïde β sur la signalisation calcique astrocytaire et les interactions neurone-glie

Thèse soutenue publiquement le **22 décembre 2016**, devant le jury composé de :

Pr Rémy Sadoul Professeur à l'université de Grenoble (Président) Dr Christian Giaume Docteur Collège de France, Paris (Rapporteur) Dr Jean-Pierre Mothet Docteur de l'université Aix Marseille (Rapporteur) Dr Jean-Claude Platel Docteur IBDM, Marseille (Examinateur) Dr Mireille Albrieux Maître de conférences de l'université de Grenoble (Directrice de thèse)



Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail de thèse. Notamment les Dr. **Christian Giaume** et **Jean-Pierre Mothet** en qualité de rapporteurs, pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce manuscrit. Je tiens également à adresser mes remerciements au Dr. **Jean-Claude Platel** en qualité d'examinateur mais également pour les différents conseils distillés avant et au cours de ma thèse par mail et lors des comités de suivi de thèse. Merci également pour m'avoir conseillé et soutenu pour la suite de ma carrière. Enfin je tiens à remercier le Pr **Rémy Sadoul** pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury lors de ma soutenance. Je suis très enthousiaste de pouvoir te présenter mes travaux de thèse, puisque comme de nombreux étudiants, c'est lors de ton UE de L3 que je me suis éveillé aux neurosciences. Je suis donc heureux de clôturer cette première boucle en ta présence.

Je souhaite adresser de profonds et chaleureux remerciements à **Mireille Albrieux** ma directrice de thèse. Ce paragraphe risque d'être un peu long et à la fois insuffisant pour résumer et exprimer toute la gratitude que je te porte, attention aux virgules qui piquent les yeux !

Je vais essayer d'être chronologique. Si c'est en L3 que je me suis éveillé aux neurosciences, c'est le stage de M1 qui m'a définitivement convaincu, d'une part parce que l'imagerie calcique et les astro constituent les piliers d'une religion qui déchire mais surtout parce que j'ai découvert une encadrante très riche humainement. Tu m'as donné ma chance alors que je commençais à me perdre dans le cursus universitaire et je t'en serai éternellement reconnaissant puisque ça fait maintenant 5 ans que je m'éclate. Je me souviens très bien du moment où tu m'as demandé si je voulais vous suivre toi et Sylvie dans cette nouvelle aventure chez Alain, pour moi la réponse était évidente...

Si c'était à refaire je ne changerai rien, la thèse constitue clairement la meilleur étape de mes études et tu y es pour beaucoup. Alors même si je ne suis pas très expressif voir un peu maladroit, sache que je te remercie du fond du cœur pour tout ce que tu m'as apporté scientifiquement et humainement durant ces années. Merci pour ton optimisme et ta tolérance dont j'essaie souvent de m'inspirer. Merci également à toi et Jean-Marc d'avoir accepté d'être à nos côtés récemment dans une étape importante de notre vie avec Delph.

Alors si finalement tout s'est un peu précipité et que je ne passe pas une année supplémentaire à tes côtés, j'espère que l'on pourra rester en contact et qui sait, peut-être que Jean-Marc souhaiterai faire un reportage photo au Canada ;)

Bref, j'aurai encore plein de chose à dire, c'est donc un immense **MERCI** que je t'adresse.

Si ces années de stage et de thèse ont été aussi géniales c'est évidemment lié à ta présence aussi... **Sylvie** ! Tu constitues avec Mireille l'autre moitié du binôme inséparable. Merci de m'avoir apporté tes conseils et ton infinie gentillesse dès mes premiers pas au labo. Ces années en ta compagnie ont été un régal, c'est aussi grâce à toi que je me suis senti super bien ici et que j'ai eu envie de continuer. Merci pour toutes les discussions qu'on a pu avoir, au coin café ou au confocal. C'était un plaisir de

prétexter venir voir ce que tu faisais comme image juste pour passer une heure ou deux à discuter de tout et de rien. Merci d'avoir enrichi ma culture que ce soit cinématographique ou de jardinage, merci également pour ta bonne humeur sans faille. Comme Mireille et Jean-Marc, nous sommes heureux avec Delph de vous compter toi et Thierry parmi nos amis. Alors voilà il est temps de passer à l'étape d'après mais ça va quand même pas être facile de vous laisser Mireille et toi et de ne plus avoir tous ces moments hors science qui ont constitués la super ambiance de ces dernières années.

Je tiens à remercier les autres membres de l'équipe, en commençant par le boss, **Alain Buisson**. Merci pour m'avoir prodigué tes conseils durant ces trois ans, depuis le concours pour la bourse de thèse jusqu'à récemment pour l'écriture du manuscrit. Merci de m'avoir initié aux joies de la SFN à Chicago. Merci pour ta simplicité et pour tous les échanges qu'on a pu avoir, en passant par les derniers résultats sportifs, ton dernier score à plant vs. zombies ou pour ton goût étrange pour les IPA et Arcade Fire.

Merci à **Fabien** pour avoir partagé la pièce d'imagerie dans la bonne humeur avec nous. Parmi les conseils en électrophy que tu m'as donné, je retiendrai surtout le fait que la LTP ne fonctionne pas l'été et que les neurones sont sensibles à la *Supplique pour être enterré à la plage de Sète*. A l'inverse merci d'avoir accepté de renouer avec tes jeunes années au son de Metallica, Judas Priest ou Motörhead. Je t'ai même surpris récemment en train de regarder un concert des Guns N' Roses.

Merci à **Murielle** qui nous a rejoint pas si récemment que ça finalement. L'experte bioch fan de John Snow du labo, une des rares personnes capable de rendre ludique cette discipline ésotérique. C'était chouette de t'avoir comme voisine au premier. Merci pour ta gentillesse et tous les bons moments passés en ta compagnie, c'était un plaisir.

Merci également à **Rebecca** (récemment renommée Google Trad), une irréductible Galloise qui résiste encore et toujours à l'envahisseur. Tu auras été la personne capable d'identifier en 2 sec le modèle de guitare en fond d'écran sur mon Pc et tu possèdes cette capacité rare de pouvoir épeler Zakk Wylde ou Black Sabbath sans faute ! Bon courage pour la suite de ta thèse dans les profondeurs du processing d'APP.

Merci à **Eve** d'avoir su rigoler les quelques fois où j'ai répondu « salut la vieille » lors de ton classique « salut les jeunes » matinal. Je te remercie également pour les bons moments passé autour d'un café.

Un merci aussi pour feu **Marta**, qui nous a quitté car récemment devenu Docteur. C'était un plaisir d'avoir partagé ces 3 ans de thèse avec toi. On aura bien rigolé/galéré dans la pièce de manip à essayer de maîtriser ces quelques techniques « rudimentaires ». Je te l'ai déjà dit lors de ta soutenance mais bonne continuation pour la suite !

Enfin pour les membres de l'équipe, mon dernier remerciement est pour **Adrien**. Sorte de Pokémon rare de type Muscu que vous trouverez au détour d'un poste de patch. Il vous gratifiera d'une évolution de stagiaire vers thésard si vous lui apportez quelques (litres) de bières. Capable de soulever 120 Kg en squats il possède néanmoins cette exceptionnelle capacité de se blesser régulièrement en patchant un neurone...

De manière plus sérieuse, j'ai vraiment apprécié ta venue au labo (même si finalement tu me mets dehors), j'ai d'abord trouvé un bon collègue puis rapidement un super pote. Grâce à tes questions et ton envie d'apprendre j'ai pu moi aussi apprendre plein de trucs. Merci c'était chouette de bosser avec toi et pouvoir partager quelques astuces. Je m'excuse (pas vraiment en fait parce que je me suis bien marré) de t'avoir attaqué à coup de bombe à la carbo ou pour « the pipette incident ». C'était un plaisir de partager des bières avec toi après le labo, même si tu m'as fait ressentir le poids des années au moment de rentrer chacun chez soi. J'espère vraiment qu'on va rester en contact, mais je n'en doute pas. En plus t'as promis de revenir à Montréal. Je t'attends avec impatience !

Bon courage pour ta thèse et tout le reste, mais t'inquiètes pas il paraît que ton encadrante déchire ! (Allez savoir pourquoi **Adrien** souhaiterait qu'on l'appel **Chanel** à l'avenir...)

Je voudrais remercier les autres étudiants de l'étage et du bureau pour les bons moments passé avec vous. Merci **Benoît**, **Julie**, **Chrystelle**, **Eléa** (PreTzel) et **Joseph**. Bon courage à vous pour la suite j'espère que tout se déroulera comme vous le souhaitez.

Merci également à tous les **membres** des Equipes **Andrieux**, **Arnal** et **Sadoul** pour tous les différents échanges que nous avons pu avoir. C'est grâce à vous que le deuxième étage a une si bonne ambiance, c'était chouette d'évoluer à vos côtés.

Je souhaite adresser des remerciements particuliers à **Elodie Fino**, **Jacques Brocard** et **Yves Goldberg** pour avoir accepté de me parrainer lors des NeuroHebdo ou pour mon CST. Merci pour vos conseils scientifiques et pour votre gentillesse.

Merci également aux anciens **membres** de **l'équipe 10** que j'ai continué de croiser au 1^{er}. C'était sympa d'avoir pu garder contact avec vous. Bonne continuation à tous.

Merci aussi à **Gui** et **Flo** pour les délires qu'on a pu avoir et pour nos différentes discussions de pessimistes révoltés. Bon courage pour vos fins de thèse respectives, ça va me manquer de ne plus vous croiser.

Au plaisir d'aller rapidement boire un coup avec vous.

Arrive le moment du tir groupé pour les potes en dehors du labo. Pour ne pas faire de jaloux je respecte l'ordre alphabétique.

Caro (enfin Josette...) Pour tes paillettes à la con qui arborent encore ma barbe !! Plus globalement merci à toi la camionneuse, et pour les bon moments passés autours d'un blanc mager coco...

Etienne, le Breton qui pourrait être mon Bro musical tellement nos goûts sont similaires. Merci pour ta bonne humeur et les tonnes de musique qu'on s'est envoyées qui m'auront inspiré pour la rédaction de ce manuscrit. Merci d'avoir partagé les parties honteuses de nos playlists respectives et pour les bières aux Metallian Fest !

Hélène, experte des terres australes, sorte de Lara Croft du Ph.D. Bravo pour ton récent titre de docteur ! Merci d'avoir ramené ton sourire Colgate à notre mariage ! Profite bien de la Nouvelle-Zélande et fait-nous un joli rapport, paraît qu'on doit y aller.

Irina (IriNoOb) & Sylvain, pour vous c'est pareil, ces quelques lignes ne seront pas suffisantes, mais merci de faire partie de nos vies, ne changez rien (ou à la limite rapprochez-vous). Merci pour tout, et même si au moment où j'écris ces quelques lignes notre weekend en commun n'est pas encore passé, je pense qu'il s'ajoutera à la longue liste de souvenirs intenses en votre compagnie. A bientôt les amis !

Lauren (La Reine des Biches...et des cookies géants !!). C'est quand même classe de se dire qu'on connait la Duchesse de Savoie !

Marie qui est probablement recherchée par les services secrets indiens pour avoir ramené illégalement de la bière. Merci pour ta bonne humeur et tes boutades. Merci pour les conseils récent et encore Bravo... qui aurait cru que les Cubs remportent un titre...

Oriane & Ju, merci pour votre côté déjanté (et je pèse mes mots...). Une mention spéciale pour le cocher. Par contre je ne vous remercie pas pour une certaine soirée pétanque tardive... trop tardive et arrosée... trop arrosée...

Simon, aka the beast même si je ne comprends pas comment un freluquet comme toi peut endosser ce surnom... haha. Bon courage pour ta soutenance toute proche, mais surtout encore une tonne de félicitations pour the mini beast !

Sylvie & Dan, idem, comment tout résumer en quelques lignes (en plus je suis sûr que Dan n'ouvrira même pas ce manuscrit, vieux flemmard). Merci de faire partie de notre cercle, merci pour toutes les discussions et votre expertise de vieux... même si je vous rejoins tranquillement. C'est une très belle rencontre de vous avoir connu, j'ai hâte qu'on aille se faire une balade en moto tous ensemble et qu'on foute une énième raclée aux gonzesses à la coinche !

Tof & So, je vais me répéter un peu mais je m'en fous c'est moi qui raconte ! Pas assez de place pour tout résumer... Merci d'être là. Merci pour la déconnade permanente, je me demande si avec Tof on a déjà eu une discussion sérieuse de bout en bout... Je vais donc respecter la tradition en espérant que le hasard ne sorte pas trop de conneries... « Pour le moment c'est chaud j'ai trouvé ma réponse sur le site officiel des choses à moitié prix. Je suis content de pouvoir te parler d'un point d'intérêt pour le goûter ».

Bien évidemment ces remerciements seraient incomplets sans quelques lignes pour **mes parents**. Merci pour tout, et bin oui hein, sans vous ces lignes n'existeraient pas. Merci pour votre soutien, pour les valeurs que vous m'avez inculqué et qui font que je n'ai jamais eu le sentiment de me lever à contre cœur pour bosser durant ma thèse. Merci d'être là je vous aime fort !

The last but not least... **Delph**... petite étudiante fraichement arrivée sur mon chemin en première année de Licence de biologie... depuis devenue pour ma plus grande fierté, ma Femme ! Tu es mon pilier dans la vie, ma motivation et ma source de bonheur. Merci d'être entrée dans ma vie et d'avoir choisi d'y rester pour reprendre quelques de tes mots ^^. Encore une fois merci pour tout ce que tu fais pour moi.

Merci également pour tous les bons petits plats que j'ai pu exhiber fièrement le midi et qui m'ont valu quelques vannes quand je cuisinais tout seul lors de tes congrès. Merci de ton soutien au jour le jour et de ton aide dans la réalisation de cette thèse. Merci d'avoir encaissé toute cette neuro et de m'avoir formé aux stats !! Merci de m'avoir fait part de tes conseils de postdoc mais attention car avec un peu de chance, bientôt tu ne seras plus la seule !

Merci pour tous les bons moments qui sont à venir...

Sommaire

ABREVIA	\TIONS
LISTE DE	<u>S FIGURES</u>
LISTE DE	S TABLEAUX 19
<u>PREAMB</u>	BULE
<u>1.</u> LES	ASTROCYTES
1.1. Pr	ESENTATION GENERALE
1.2. M	ARQUEURS ASTROCYTAIRES ET CARACTERISTIQUES ELECTROPHYSIOLOGIQUES
1.3. Pr	OPRIETES MEMBRANAIRES DES ASTROCYTES ET ACTEURS DE LA SIGNALISATION
1.3.1. CA	NAUX IONIQUES
1.3.1.1.	Canaux sodiques dépendants du voltage Nav26
1.3.1.2.	Canaux potassiques K ⁺
1.3.1.3.	Canaux calciques dépendants du voltage VGCCs 29
1.3.1.4.	Transient receptor potential channels, TRPs
1.3.1.5.	Canaux anioniques
1.3.1.6.	Aquaporines AQPs
1.3.2. Re	CEPTEURS AUX NEUROTRANSMETTEURS
1.3.2.1.	Récepteurs glutamatergiques
1.3.2.2.	Récepteurs au GABA (γ-aminobutyric acid)
1.3.2.3.	Récepteurs purinergiques
1.3.2.4.	Autres types de récepteurs aux neurotransmetteurs
1.3.3. Tr	ANSPORTEURS ET ECHANGEURS ASTROCYTAIRES
1.3.3.1.	Transporteurs
1.3.3.2.	Echangeur sodium / calcium
1.3.4. Jo	NCTIONS COMMUNICANTES ET HEMICANAUX
1.3.4.1.	Jonctions communicantes
1.3.4.2.	Hémicanaux
1.4. Sic	GNALISATION INTRACELLULAIRE ASTROCYTAIRE
1.4.1. LA	SIGNALISATION CALCIQUE ASTROCYTAIRE
1.4.1.1.	Les sources du calcium astrocytaire 48
1.4.1.2.	Les territoires astrocytaires et la compartimentation de la signalisation calcique
astrocyta	aire
1.4.2. LE	S AUTRES SUPPORTS DE L'EXCITABILITE ASTROCYTAIRE
1.5. Pr	INCIPALES FONCTIONS ASTROCYTAIRES
1.5.1. Ne	UROGENESE ET GLIOGENESE

1.5.2.	GENESE, MAINTIEN ET ELIMINATION DES SYNAPSES	57
1.5.3.	BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE	59
1.5.4.	SUPPORT ENERGETIQUE ET METABOLIQUE	59
1.5.5.	HOMEOSTASIE IONIQUE ET REGULATION DE L'OSMOLARITE.	61
1.5.6.	GLIOTRANSMISSION.	62
1.5.7.	ASTROCYTES ET ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE (ROS).	64
1.6.	SYNAPSE TRIPARTITE	64
<u>2.</u> N	IALADIE D'ALZHEIMER ET ASTROCYTES	69
2.1.	LA MALADIE D'ALZHEIMER	69
2.1.1.	GENERALITES.	69
2.1.2.	EPIDEMIOLOGIE	69
2.1.2.	1. Facteurs génétiques	69
2.1.2.	2. Facteurs de risque et facteurs protecteurs	70
2.1.3.	PHYSIOPATHOLOGIE GENERALE DE LA MALADIE.	71
2.1.4.	LE PEPTIDE AMYLOÏDE BETA (AB).	72
2.1.5.	L'HYPOTHESE CALCIQUE	74
2.1.6.	SYNAPTOTOXICITE D'AB	75
2.1.7.	LA PHASE CELLULAIRE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER	77
2.2.	ASTROCYTES ET MALADIE D'ALZHEIMER	80
2.2.1.	ASTROCYTES ET QUELQUES MALADIES NEURODEGENERATIVES.	80
2.2.1.	1. Maladie de Huntington	80
2.2.1.	2. Maladie de Parkinson	80
2.2.1.	3. Syndrome de Down (trisomie 21).	81
2.3.	ASTROCYTES ET AB	82
2.3.1.	ALTERATIONS MORPHOLOGIQUES ASTROCYTAIRES EN PRESENCE D'AB	82
2.3.2.	SIGNALISATION CALCIQUE ASTROCYTAIRE EN PRESENCE D'AB	84
<u>3.</u> 0	BJECTIFS	<u>89</u>
4. N	IATERIEL ET METHODES	91
4.1.	DESCRIPTION DE LA METHODE DE CHARGEMENT D'UN ASTROCYTE UNIQUE PAR LE FLUO-4	91
<u>5.</u> <u>R</u>	ESULTATS	<u>97</u>
5.1.	ARTICLE SCIENTIFIQUE.	97
5.2.	POINTS CLES DE L'ARTICLE	.38

<u>6.</u>	DISCUSSION ET PERSPECTIVES
6.1	IMPACT D'AB ₁₋₄₂ SUR L'ACTIVITE CALCIQUE ASTROCYTAIRE140
6.2.	TRPA1, CIBLE D'ABO
6.3	Hyperactivite calcique astrocytaire precoce chez la souris APP/PS1-21
6.4. GLU	REPERCUSSION DE L'HYPERACTIVITE CALCIQUE ASTROCYTAIRE SUR LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE
6.5.	CONCLUSION154
<u>RÉF</u>	ÉRENCES157
<u>7.</u>	ANNEXES
7.1.	PUBLICATION SCIENTIFIQUE (GLIA 2015)181
7.2.	SOCIETY FOR NEUROSCIENCES 2015

Abréviations

6-OHDA	6 Hydroxydopamine
AD	Alzheimer's disease / Maladie d'Alzheimer
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase family enzyme
Aldh1L1	Protéine L1 de la famille des aldéhydes déshydrogénases
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate
AMPc	Acide monophosphate cyclique
AP5	Acide D,L-2-amino-5-phosphonopentanoique
APH-1	Anterior pharynx defective1
ΑΡΟΕ	Apolipoprotéine E
APP	Amyloïd precursor protein / Précurseur de la protéine amyloïde
AQP	Aquaporine
ARN	Acide ribonucléique
АТР	Adénosine triphosphate
Aβm	Amyloïde beta monomérique
Αβο	Amyloïde beta oligomérique
BACE	eta-site APP-cliving enzyme 1 / Enzyme de clivage d'APP sur le site eta
Best-1	Bestrophine-1
BHE	Barrière hémato encéphalique
CA1	Corne d'ammon 1
CALHM1	Ca ²⁺ homeostasis modulator 1 / Modulateur 1 de l'homéostasie Ca ²⁺
CICR	Ca ²⁺ induced Ca ²⁺ release / Libération de Ca ²⁺ induite par le Ca ²⁺
CLC	Canaux anionique
CLEM	Correlative Light Electron Microscopy / Microscopie électronique corrélative
Сх	Connexine
DAAO	D-amino acid oxydase
DG	Gyrus denté
DHPG	Dihydroxyphenylglycine
DNF	Dégénérescence neurofibrillaire
EAAT	Excitatory amino acid transporter / Transporteur des acides aminés excitateurs
GABA	γ-aminobutyric acid
GAT	GABA transporteur
GECI	Genetically encoded Ca ²⁺ indicator / Sonde Ca ²⁺ génétique
GFAP	Glial fibrillary acidic protein / Protéine acide fibrillaire gliale
GLAST	Glutamate aspartate transporteur
GLT1	Glutamate transporteur 1
GLUT	Glucose transporteur
GlyT	Glycine transporteur
GS	Glutamine synthétase
GWAS	Genome wild association study / Etude d'association pangénomique
IP3	Inositol triphosphate
iPSC	Induced pluripotent stem cell / Cellule souche pluripotente induite
K _{2P}	Two pore domain K ⁺ channel
K _A	Rapidly inactivating A-type channels
К _{Са}	Calcium-activated K ⁺ channles

K _D	Delayed rectifier K ⁺ channels					
K _{ir}	Inward rectifier K ⁺ channels					
LTD	Long term depression / Dépression à long terme					
LTP	Long term potentiation / Potentialisation à long terme					
MCI	Mild cognitive impairments / Troubles cognitifs légers					
mEPSC	Mini excitatory post synaptic currents / Courants post synaptiques excitateurs miniatures					
mGluR	Métabotropique glutamate récepteur					
MSN	Medium spiny neuron / Neurones épineux moyens					
Na _v	Canaux sodiques dépendants du voltage					
NBC	Transporteurs Na ⁺ /HCO3 ⁻					
NBQX	2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline-2,3-dione					
NCX	Echangeur sodium calcium					
NKCC	Transporteurs Na ⁺ /K ⁺ /Cl ⁻					
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique					
P2X	Récepteur ionotropique à l'ATP					
P2Y	Récepteur métabotropique à l'ATP					
Panx	Pannexine					
PEN	Presenilin enhancer					
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate					
PLC	Phospholipase C					
PMCA	Plasmalemmal Ca ²⁺ ATP-ase					
PS1&2	Préseniline 1 & 2					
PSD-95	Post synaptic density-95 / Densité post synaptique 95					
ROI	Région d'intérêt					
ROS	Reactive oxygen species / Espèces réactives de l'oxygène					
RyR	Ryanodin receptor / Récepteur de la ryanodine					
\$100β	S100 caclium binding protein β / Protéine S100 β de liaison au Ca ²⁺					
sEPSC	Spontaneous excitatory post synaptic currents / Courants post synaptiques éxcitateurs spontanés					
SERCA	Sarcoplasmic reticulum ATP-ase					
SNAP	Synaptosome associated protein					
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor associated protein receptor					
SNC	Système nerveux central					
SNr	Substantia nigra reticulata					
SOD1	Superoxyde dismutase 1					
TREM2	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2					
TRP	Transient receptor potential channel					
TRPA1	Transient receptor potential ankyrin 1					
TSP-1	Thrombospondine-1					
ттх	Tétrodotoxine					
VAMP	Vesicule-associated protein					
VGCC	Canaux calciques dépendant du voltage					
VGLUT	Transporteur vésiculaire du glutamate					
VNUT	Transporteur vésiculaire de nucléotide					
α7nAChR	α 7 nicotinic acetylcholine receptor / Récepteur α 7 nicotinique à l'acétylcholine					

Liste des figures

FIGURE 1 MORPHOLOGIE ET DIVERSITE ASTROCYTAIRE.	24
FIGURE 2 STRUCTURE DE TRPA1.	31
FIGURE 3 SCHEMA RECAPITULATIF DES EFFETS DE L'INHIBITION DE TRPA1.	33
FIGURE 4 RECEPTEURS AUX NEUROTRANSMETTEURS ASTROCYTAIRES.	37
FIGURE 5 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA SIGNALISATION GABAERGIQUE ASTROCYTAIRE.	40
FIGURE 6 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES TRANSPORTEURS ASTROCYTAIRES ET DE LEURS FONCTIONS PRINCIPALES.	45
FIGURE 7 LES DIFFERENTES SOURCES DU CALCIUM ASTROCYTAIRE.	49
FIGURE 8 MECANISMES REGENERATIF DE LA PROPAGATION DU CALCIUM DEPUIS LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE.	50
FIGURE 9 DIVERSITE DES ACTIVITES CALCIQUES ASTROCYTAIRES AU NIVEAU DE L'HIPPOCAMPE DE SOURIS ADULTES.	53
FIGURE 10 COUPLAGE ENERGETIQUE ENTRE ASTROCYTES ET NEURONES.	61
FIGURE 11 MECANISMES IMPLIQUES DANS LA GLIOTRANSMISSION.	64
FIGURE 12 L'ASTROCYTE COMME TROISIEME ELEMENT DE LA SYNAPSE TRIPARTITE.	65
FIGURE 13 RECONSTRUCTION 3D DE SYNAPSES ENROBEES PAR LES ASTROCYTES.	67
FIGURE 14 LESIONS MACROSCOPIQUES ET HISTOLOGIQUES CARACTERISTIQUES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.	71
FIGURE 15 DISTRIBUTION SPATIALE ET TEMPORELLE DES ENCHEVETREMENTS NEUROFIBRILLAIRES ET DEPOTS AMYLOÏDES.	72
FIGURE 16 PROTEOLYSE D'APP.	73
FIGURE 17 L'HYPOTHESE CALCIQUE LIEE A LA MALADIE D'ALZHEIMER.	75
FIGURE 18 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA FIBRILLOGENESE D'AB.	76
FIGURE 19 RECEPTEURS D'AB ET CASCADE D'EVENEMENTS INDUITS PAR LA TOXICITE D'AB.	77
FIGURE 20 PHASES BIOCHIMIQUE, CELLULAIRE ET CLINIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.	79
FIGURE 21 DECOURS SPATIO-TEMPOREL DES CHANGEMENTS MORPHOLOGIQUES ASTROCYTAIRE BASES SUR L'ETUDE DE L'EXPR	ESSION
de la GFAP.	84
FIGURE 22 PROPAGATION DE VAGUES CALCIQUES EN PRESENCE D'AB ₁₋₄₂ .	86
FIGURE 23 HYPERACTIVITE ASTROCYTAIRE CHEZ LA SOURIS APP/PS1-21.	87
FIGURE 24 METHODE D'ETUDE DE L'ACTIVITE CALCIQUE ASTROCYTAIRE SUR TRANCHE AIGUE D'HIPPOCAMPE AU NIVEAU DES	
PROLONGEMENTS ASTROCYTAIRES.	94
FIGURE 25 EXEMPLES DE PROJECTIONS EN Z DU VOLUME ASTROCYTAIRE REVELE PAR LE CHARGEMENT EN FLUO-4 DANS L'ENSE	EMBLE DU
TERRITOIRE ASTROCYTAIRE.	96
FIGURE 26 DETECTION OF GLOBAL AND COMPARTIMENTALIZED CA ²⁺ EVENTS IN ASTROCYTES.	104
FIGURE 27 SPONTANEOUS CA ²⁺ EVENTS ARE FULLY AUTONOMOUS AND PARTLY DEPEND ON EXTERNAL CA ²⁺ ENTRY.	106
FIGURE 28 EXTRACELLULAR ABO APPLICATION INDUCES ASTROCYTES HYPERACTIVITY.	108
FIGURE 29 TRPA1 CHANNELS MEDIATE ASTROCYTIC HYPERACTIVITY.	112
FIGURE 30 YOUNG APP/PS1-21 MICE ARE DEVOID OF AMYLOID DEPOSITS AND REACTIVE ASTROCYTE WHEREAS GRADUALLY	
OVEREXPRESS TRPA1.	115

FIGURE 31 YOUNG APP/PS1-21 MICE DISPLAY AN EARLY ASTROCYTIC COMPARTMENTALIZED HYPERACTIVITY.	116
FIGURE 32 ABO INCREASES THE FREQUENCY OF SPONTANEOUS EXCITATORY POST-SYNAPTIC CURRENTS (SEPSCS) FROM CA1	
PYRAMIDAL NEURONS IN A TRPA1 CHANNELS DEPENDENT MANNER.	118
FIGURE 33 SUPPLEMENTARY FIGURE 1: CHARACTERIZATION OF FLUO-4-LOADED CELLS IN THE STRATUM RADIATUM OF MOUSE	
CORONAL SLICE.	130
FIGURE 34 SUPPLEMENTARY FIGURE 2: CHARACTERIZATION AND EFFECTS OF AB OLIGOMERS AND PURIFIED MONOMERS.	131
FIGURE 35 SUPPLEMENTARY FIGURE 3: TRPA1 IS PREFERENTIALLY EXPRESSED IN STRATUM RADIATUM ASTROCYTES.	132
FIGURE 36 SUPPLEMENTARY FIGURE 4: SPATIAL PROPERTIES OF COMPARTMENTALIZED CALCIUM EVENTS IN THE ASTROCYTIC	
PROCESSES.	133
FIGURE 37 ANALYSE DE SHOLL EN 3D A PARTIR DE PROJECTIONS EN Z D'ASTROCYTES CHARGES AVEC LE FLUO-4.	143
FIGURE 38 PROPOSITION DU MODE D'ACTION PRECOCE D'ABO SUR L'ACTIVITE CALCIQUE ASTROCYTAIRE ET SUR LA TRANSMISSIO	N
SYNAPTIQUE NEURONALE.	154

Liste des tableaux

TABLEAU 1 CANAUX IONIQUES ASTROCYTAIRES LOCALISATION ET FONCTIONS PRINCIPALES.	28
TABLEAU 2 Les canaux TRPs dans differentes especes.	30
TABLEAU 3 EXPRESSION, MODULATEURS, ROLES PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES DES CANAUX TRPA1.	34
TABLEAU 4 FACTEURS GLIAUX CONTROLANT LE DEVELOPPEMENT SYNAPTIQUE.	58
TABLEAU 5 FACTEURS GENETIQUES IDENTIFIES PAR ETUDES D'ASSOCIATION PANGENOMIQUES.	70
TABLEAU 6 Resume des effets d'Ab sur la signalisation astrocytaire.	88

Préambule

Les cellules gliales, depuis leur découverte en 1858 par Rudolf Virchow (Virchow, 1858), ont longtemps été considérées comme de simples éléments passifs et structuraux remplissant le rôle de ciment entre les neurones. Pourtant, Carl Ludwig Schleich en 1894, supposait déjà que les neurones et les astrocytes puissent interagir, postulant alors que neurones et astrocytes soient des partenaires. Grâce à leur changement de volume, en se rapprochant ou se retirant de la synapse, les astrocytes représenteraient un mécanisme de contrôle de l'activité neuronale (Schleich, 1894). Paradoxalement, son postulat était énoncé la même année que celui de la doctrine neuronale par Sigmund Exner, qui privilégiait un fonctionnement du cerveau purement basé sur les échanges entre neurones. Tributaire de leur incapacité à émettre des potentiels d'actions, le clivage entre cellule excitable (les neurones) et de support (la glie) a persisté du point de vue de nombreux neuroscientifiques.

Pendant près d'un siècle, les cellules gliales n'ont que très peu suscité la curiosité scientifique. Le regain d'intérêt pour les cellules gliales et les astrocytes s'est produit en 1984 lorsque le groupe allemand d'Helmut Kettenmann, a mis en évidence la présence de récepteurs au glutamate et au GABA à la surface des astrocytes responsables de leur dépolarisation en culture (Kettenmann et al., 1984). Dès lors les astrocytes ne pouvaient plus être considérés comme des cellules passives.

Les avancées technologiques favorisées par le développement de l'imagerie calcique, ont permis de mettre en évidence que les astrocytes répondent au glutamate par des élévations de la concentration de calcium intracellulaire, ce qui représenta une découverte capitale (Cornell-Bell et al., 1990). Ces observations ont conduit à une explosion des travaux menés sur les cellules gliales. Ainsi les astrocytes ont progressivement été réintégrés au cœur du fonctionnement de la synapse et le postulat de Schleich fut finalement validé par le concept de la synapse tripartite (Araque et al., 1999). Il est actuellement clairement établi que les cellules gliales et plus particulièrement les astrocytes sont des partenaires indispensables de la transmission synaptique capables d'en moduler l'activité (Dallérac and Rouach, 2016). Leur implication cruciale dans le fonctionnement physiologique du cerveau et de la synapse, place les astrocytes comme des acteurs de première ligne dans des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, ce que nous tenterons de démontrer à travers ce manuscrit.

Le manuscrit sera composé d'une introduction faisant l'état des connaissances actuelles sur les propriétés et les fonctions des astrocytes. Puis le rôle des astrocytes au sein des interactions neurones-glie et les modifications astrocytaires lors de la maladie d'Alzheimer seront décrits.

Le but de l'introduction sera de fournir un support permettant de comprendre et de discuter les différents aspects de ce projet de thèse. Les différentes parties et thématiques abordées dans cette introduction ont été choisies en fonction de leur relation avec le projet de thèse.

1. Les astrocytes

1.1. Présentation générale.

La glie, qui définit l'ensemble des cellules non neuronales, est principalement constituée d'astrocytes qui représentent à eux seuls 20 à 40 % de la totalité des cellules du cerveau chez les mammifères. Le terme d'astrocyte fut introduit par Michael Von Lenhossek (Lenhossek M, 1893) en référence à leur forme étoilée. Les astrocytes participent à l'essentiel des fonctions du système nerveux central (SNC) telles que la régulation du flux sanguin, le métabolisme énergétique, l'homéostasie ionique et hydrique, la défense immunitaire, la neurogénèse adulte et bien sûr la neurotransmission (Zhang & Barres 2010; Oberheim et al. 2012; Sosunov et al. 2014; Khakh & Sofroniew 2015). Il n'est donc pas surprenant qu'en dépit d'un nom commun, les astrocytes consistent néanmoins en une classe de cellules très hétérogènes (Figure 1). Ainsi Rudolf Albert von Kölliker et William Lloyd Andriezen ont classés les astrocytes en deux classes principales, protoplasmiques et fibreux, localisés dans la matière grise et blanche respectivement (Parpura et al., 2012). La majorité des astrocytes du stratum radiatum de l'hippocampe (qui seront traités dans ce manuscrit) sont des astrocytes protoplasmiques. Chez les rongeurs, ces astrocytes sont composés d'un soma d'environ 10 um de diamètre qui se diversifie ensuite en 4 à 10 prolongements principaux, puis en plusieurs centaines voire milliers de prolongements fins plus distaux, qui formeront pour certains des contacts directs avec les synapses (Khakh and Sofroniew, 2015). Cette ramification complexe des astrocytes s'organise en un territoire « spongiforme » présentant de nombreuses interconnections entre les prolongements fins couvrant un diamètre de 40 à 60 μ m pour un volume d'environ 6,6.10⁴ μ m³. Ainsi il est estimé qu'un seul astrocyte peut à lui seul contacter plus de 140 000 synapses au sein de l'hippocampe (Bushong et al., 2002) et donc probablement coordonner l'activité d'autant de synapses.

Dans cette partie, nous décrirons les caractéristiques astrocytaires ainsi que leurs principales fonctions intervenant lors du fonctionnement physiologique du cerveau. Puis nous nous intéresserons plus particulièrement aux interactions entre neurones et astrocytes et aux fonctions plus complexes faisant intervenir la synapse tripartite.



Figure 1 Morphologie et diversité astrocytaire. (A) Sous-types d'astrocytes. la tanycyte. Ib tanycytes vasculaire. Il astrocyte radiaire (glie de Bergmann). III astrocyte marginal. IV astrocyte protoplasmique. V astrocyte velu. VI astrocyte fibreux. VII astrocyte péri vasculaire. VIII astrocyte inter laminaire. IX astrocyte immature. X épendymocyte. XI cellule du plexus choroïde. (Reproduit à partir de Verkhratsky & Butt 2013). (B) Reconstructions de projections en Z d'astrocytes obtenus par microscopie confocale à partir de différentes régions du cerveau. Issu d'un modèle de souris transgéniques exprimant l'*enhanced green fluorescent protein* sous le contrôle d'un promoteur spécifiquement glial (Emsley and Macklis, 2006).

1.2. Marqueurs astrocytaires et caractéristiques électrophysiologiques.

Si les travaux de recherche portant sur les astrocytes ne se sont développés qu'à partir des années 1990, la prise en compte de la notion d'hétérogénéité astrocytaire est encore plus récente. Au-delà d'une morphologie pouvant varier, il s'est avéré que les astrocytes n'exprimaient pas tous, ou selon des degrés différents, les mêmes protéines membranaires et structurales.

Par exemple la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), une protéine des filaments intermédiaires exprimée par les astrocytes, est classiquement utilisée pour identifier les astrocytes dans le système nerveux central. Cependant, des travaux ont mis en évidence que tous les astrocytes n'exprimaient pas la GFAP et qu'à l'inverse certaines cellules non astrocytaires pouvaient l'exprimer, comme les cellules souches neuronales de la zone sousventriculaire (Doetsch et al. 1999; Kimelberg 2004; Mishima & Hirase 2010). Il a également été estimé que le marquage par immunohistochimie de la GFAP ne pouvait révéler, dans les conditions les plus propices que 15 % du volume d'un astrocyte chez le rongeur (Bushong et al., 2002). Enfin, les niveaux d'expressions de la GFAP sont variables en fonction des régions du SNC, du vieillissement et de l'état physiologique (Khakh and Sofroniew, 2015). Il a donc été nécessaire d'identifier d'autres marqueurs astrocytaires adaptés aux différentes régions, espèces et stades de vieillissement du SNC. Parmi ces autres marqueurs astrocytaires classiquement utilisés, on trouve : deux autres protéines des filaments intermédiaires, la vimentine et la nestine (Chiu and Norton, 1982; Kamphuis et al., 2015; Pekny et al., 1999), une protéine de liaison au calcium S100B (Rickmann and Wolff, 1995), une enzyme impliquée dans la conversion du glutamate en glutamine, la glutamine synthétase GS (Martinez-Hernandez et al. 1977), les transporteurs du glutamate GLT-1 et GLAST (Glutamate Transporter 1 et Glutamate Aspartate Transporter) qui appartiennent aux EAAT1 et EAAT2 (Excitatory Amino Acid Transporter 1 & 2; Danbolt et al. 1992; Lehre et al. 1995), les connexines 30 et 43 qui sont des protéines des jonctions communicantes (Nagy and Rash, 2000) et enfin la protéine L1 de la famille des aldéhydes déshydrogénases Aldh1L1 qui est décrite comme spécifiquement astrocytaire au niveau du SNC, d'expression homogène et qui permettrait de mettre en évidence la majeure partie de l'arborisation astrocytaire (Cahoy et al., 2008; Neymeyer et al., 1997).

A contrario, certaines caractéristiques électrophysiologiques des astrocytes sont quant à elles plus homogènes (Mishima and Hirase, 2010). En effet une propriété électrophysiologique qui

Les astrocytes

démarque les astrocytes des neurones est d'avoir un potentiel membranaire de repos très hyperpolarisé, -70 à -90 mV, proche du potentiel d'équilibre du potassium. Ils présentent également pour la plupart une faible résistance d'entrée ($76 \pm 7 M\Omega$ pour les astrocytes de la région CA1 de l'hippocampe) due à leur fort couplage *via* les jonctions gap (D'Ambrosio et al., 1998) et une relation courant/potentiel linéaire (Bordey et al. 1997). Enfin s'ils possèdent des canaux sodiques dépendants du voltage, leur densité est trop faible au regard de celle des neurones pour leur permettre d'émettre des potentiels d'action. Toutefois, à l'instar des neurones, les astrocytes expriment tous les principaux canaux ioniques, récepteurs et transporteurs aux neurotransmetteurs.

1.3. Propriétés membranaires des astrocytes et acteurs de la signalisation.

Certaines propriétés électrophysiologiques astrocytaires ont été énoncées précédemment et dépendent pour la plupart directement de la répartition des ions de part et d'autre de la membrane plasmique. Cette répartition est dans l'ensemble similaire à celle des neurones à l'exception de l'ion chlorure qui se trouve inversée (Rose, 2010). Ainsi, l'ouverture de canaux perméables aux ions Cl⁻ se traduira par une sortie de Cl⁻ vers l'espace extracellulaire conduisant à une dépolarisation du potentiel membranaire.

Cette partie abordera les généralités et spécificités relatives aux canaux ioniques, aux récepteurs aux neurotransmetteurs et aux transporteurs exprimés au niveau de la membrane astrocytaire. Certains de ces acteurs seront plus amplement décrits en écho aux travaux présentés dans ce manuscrit.

1.3.1. Canaux ioniques.

Parmi les canaux ioniques exprimés par les astrocytes on retrouve les canaux perméables au Na^+ , K^+ et Ca^{2+} , certains canaux non sélectifs et différents canaux anioniques (**Tableau 1**).

1.3.1.1. Canaux sodiques dépendants du voltage Na_v.

Les canaux sodiques dépendants du voltage (Na_v) sont les éléments essentiels à l'excitabilité électrique et la découverte de leur présence sur des astrocytes en culture se révéla surprenante (Bevan et al., 1985) puisque les astrocytes étaient décrits comme totalement passifs électriquement. Leur expression à la surface des astrocytes est régulée développementalement et il a été montré sur tranche aigue d'hippocampe de souris que leur expression concerne 90 % des astrocytes à P50 (Bordey et al., 1997). Cependant, comme il a été évoqué précédemment, leur faible densité estimée à 1 Na_v par 10 μ m² *vs.* 100 à 1000 par 10 μ m² pour les neurones combinée au potentiel de repos élevé, ne leur permet pas l'émission de potentiels

d'action en condition physiologique. Le rôle de ces canaux n'est à l'heure actuelle que supposé, ils seraient impliqués dans le contrôle de la prolifération, la migration et la différenciation des cellules gliales ainsi que dans l'apparition de l'astrogliose (Pappalardo et al., 2014). Par ailleurs, plusieurs travaux ont démontré que leur expression est significativement augmentée lors de contexte pathologique. Ainsi, certains astrocytes sont capables de générer des activités électriques similaires à des potentiels d'action à la suite d'ischémie cérébrale ou à proximité de foyers épileptiques (O'Connor et al. 1998; Black et al. 2010).

Les astrocytes

Canal ionique	Identité moléculaire	Localisation <i>in situ</i>	Fonction principale	
Canaux sodiques Nav	Na _v 1.1, Na _v 1.2, & Na _v 1.3	Astrocytes <i>in vitro</i> & moelle épinière	Régulation différenciation, prolifération et migration (?)	
Canaux potassiques				
Inward rectifier K _{ir}	K _{ir} 4.1 (majoritaire) K _{ir} 2.1, 2.2, 2.3 K _{ir} 3.1 K _{ir} 6.1, 6.2	Ubiquitaire	Maintien du potentiel membranaire ; Tamponnage du K [⁺]	
Delayed rectifier K _D	Delayed rectifier K _v 1.1, 1.2, 1.5, 1.6 Ubiquitaire K _p		Inconnue, probablement impliqués dans la régulation de la prolifération	
Rapidly inactivating A- type K _A	K _A 1.4	Hippocampe ; astrocytes in vitro	Inconnue	
Calcium activated K _{Ca}	K _{Ca} 3.1	Cortex	Inconnue	
Indépendant du voltage	Two-pore domain K [⁺] K _{2p} TREK1 TREK2 TWIK	Hippocampe ; bulbe olfactif ; cervelet ; neurones & astrocytes	Contribuent au maintien du potentiel membranaire ; senseurs et régulateurs de la transmission glutamatergique	
Canaux calciques dépendant du voltage VGCC	L-(Ca _v 1.2), N-(Ca _v 2.2), P/Q (Ca _v 2.1), R(Ca _v 2.3), T (Ca _v 3.1)	Astrocytes <i>in vitro</i> ; expression fonctionnel <i>in</i> <i>situ</i> (controversé)	Inconnue	
Transient Receptor Potential TRP	TRPA1 voir Tableau 3 Pour TRP C, M, ML, N, P, V voir (Nilius & Owsianik 2011)			
Canaux anioniques	CLC1, CLC2, CLC3	Ubiquitaire	Transport des ions Cl ⁻ ; Régulation du volume cellulaire	
Bestrophine 1	Best-1	Epithélium pigmentaire rétinien ; neurones périphériques ; astrocytes <i>in vitro ;</i> DG & CA1 de l'hippocampe (souris)	Régulation du volume de l'épithélium pigmentaire rétinal (homme) ; libération de glutamate et GABA au niveau synaptique ; régulation de l'activité synaptique basal et à long terme	
Aquaporines AQP	AQP4 (majoritaire) AQP9	AQP4 ubiquitaire AQP9 astrocytes tronc cérébral ; cellules épendimaires ; tanycytes hypothalamus	Transport de l'eau et homéostasie hydrique	

Tableau 1 Canaux ioniques astrocytaires : localisation et fonctions principales.

1.3.1.2. Canaux potassiques K^{\dagger} .

Les canaux potassiques sont probablement les canaux les plus fortement exprimés par les cellules gliales. Les astrocytes expriment quatre types de canaux potassiques dépendants du voltage : les *inward rectifier* K^+ *channels* (K_{ir}), *delayed rectifier* K^+ *channels* (K_D), *rapidly inactivating A-type channels* (K_A) et les *calcium-activated* K^+ *channels* (K_{Ca}). Parmi les canaux potassiques dépendants du voltage, K_{ir}4.1 attire particulièrement l'attention des neuroscientifiques. D'une part car il est exclusivement exprimé par les cellules gliales et participerait aux différentes fonctions de l'homéostasie potassique, du maintien du potentiel membranaire et de la recapture du glutamate. D'autre part car son expression se trouve diminuée dans diverse pathologies du SNC comme l'épilepsie (Scholl et al. 2009), la maladie d'Alzheimer (Wilcock et al., 2009), la sclérose latérale amyotrophique (Bataveljić et al., 2012) et d'autres (pour revue voir Olsen et al. 2015).

Les astrocytes expriment également des canaux potassiques indépendants du voltage. Ils sont représentés par les *two-pore forming channels* (K_{2p}). Cette famille comprend les canaux TREK-1 & 2 ainsi que TWIK-1 qui ont été identifiés au niveau astrocytaire (Cahoy et al., 2008; Seifert et al., 2009; Zhou et al., 2009). Les canaux TREK sont activables par de nombreux facteurs tels que les protons, la température, le stress mécanique ou encore certains phospholipides et acides gras polyinsaturés. La physiologie des canaux TWIK est moins connue, mais lorsqu'ils sont adressés à la membrane, ils deviennent des canaux perméables non sélectifs aux cations monovalents. De nombreux travaux portent sur ces canaux car TREK-1 serait capable de libérer du glutamate lorsqu'il est activé et TWIK-1 agirait quant à lui comme un senseur de la transmission glutamatergique (Olsen et al., 2015).

Les canaux potassiques astrocytaires sont également concernés par une diversité d'expression en fonction des régions du SNC ou ils sont exprimés et participent ainsi à l'hétérogénéité astrocytaire (Matyash and Kettenmann, 2009; Verkhratsky and Steinhäuser, 2000).

1.3.1.3. Canaux calciques dépendants du voltage VGCCs.

Si leur rôle supposé de canaux permettant une voie d'entrée privilégié pour le calcium astrocytaire semble évident, leur expression n'est à l'heure actuelle démontrée qu'*in vitro* (MacVicar et al. 1991; Parpura et al. 2011). *In situ* et *in vivo*, les différentes observations de VGCCs ont souvent résulté de la confusion entre astrocytes et cellules NG-2. Ce type de cellules gliales partagent en effet certaines caractéristiques communes avec les astrocytes et la mise en évidence de l'existence des cellules NG-2 est récente (Akopian et al., 1996). Une étude suggère néanmoins une augmentation de l'expression des VGCCs au niveau

Les astrocytes

d'astrocytes réactifs, et donc l'apparition de courant induit par ces canaux lors de contextes pathologiques particuliers comme le *status epilepticus* induit par injection de pilocarpine (Xu, et al. 2007).

1.3.1.4. Transient receptor potential channels, TRPs.

Cette section décrira les caractéristiques communes aux canaux TRPs puis une attention particulière sera portée au canal TRPA1 au regard de son implication dans ce travail de thèse.

La superfamille des canaux cationiques TRPs regroupe 28 membres chez les mammifères (à l'exception de 27 pour l'homme) subdivisés en sept familles (**Tableau 2**).

 Tableau 2 Les canaux TRPs dans différentes espèces. Les nombres correspondent aux différentes isoformes de chaque sous-familles (adapté d'après Nilius & Owsianik 2011).

	Drosophilia melanogaster	Caenorhabditis elegans	Ciona intestinalis	Fugu rubripes	Danio rerio	Mus musculus	Homo sapiens
TRPC	3	3	8	8	8	7	6
TRPM	1	4	2	6	6	8	8
TRPML	4	1	9	2	2	3	3
TRPN	1	1	1	-	1	-	-
TRPP	1	1	1	4	4	3	3
TRPV	3	5	2	4	4	6	6
TRPA	4	2	4	1	2	1	1
Total	17	17	27	25	27	28	27

Les canaux TRP sont exprimés de façon ubiquitaire sur les membranes cellulaires à l'exception de la mitochondrie et de l'enveloppe nucléaire. Les différents canaux TRPs possèdent la caractéristique commune d'être perméables aux cations, afin de permettre dans certains cas une entrée de calcium depuis le milieu extracellulaire. Leurs fonctions courantes sont des fonctions sensorielles et de régulation de l'homéostasie ionique. Ainsi, ils peuvent intervenir dans des fonctions s'étendant de la transduction du goût à la nociception, la thermoception ainsi que la régulation des entrées de Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺ et d'osmorégulation (pour revue voir Nilius & Owsianik 2011).

Un membre de la famille des TRPs, fort de ses caractéristiques particulières, s'est révélé être important dans la signalisation astrocytaire, le canal TRPA1 (Transient Receptor Channel Ankyrin-1). Le gène *trpa1* fut originalement cloné à partir de fibroblastes de poumon humain en 1999 (Jaquemar et al., 1999). TRPA1 fut initialement baptisé ANKTM1 en raison de ses nombreux domaines de répétition ankyrine (Story et al., 2003). En effet, la particularité structurale de ce canal, qui le distingue des autres membres de la famille des TRPs, est la présence de 14 à 19 domaines de répétition ankyrine (qui permettent l'interaction avec le cytosquelette d'actine notamment) sur la partie N-terminale de la protéine (**Figure 2**). La structure de la protéine n'est pas clairement définie, elle serait composée de 6 domaines transmembranaires (S1 à S6) organisés en homotétramères, pour un poids moléculaire de 120 - 130 kDa chez l'homme et 110 - 115 kDa chez la souris. Le pore constituant le canal se situe entre les domaines S5 et S6 et possède deux conformations, faiblement ouvert ou largement ouvert suite à l'activation de TRPA1, ce qui permet au calcium de passer du milieu extracellulaire au cytoplasme des cellules exprimant TRPA1 (Paulsen et al., 2015).



Figure 2 Structure de TRPA1. Diagramme linéaire (partie haute) présentant les domaines structuraux majeurs et diagramme en ruban (partie basse) représentant 3 vues d'une sous-unité TRPA1 (Paulsen et al., 2015)

Actuellement TRPA1 est considéré comme une sorte de senseur activé par différentes formes de stress (mécanique, métabolique, inflammatoire, *etc.*) et dont la réponse permettrait l'intégration de ce stress. Ce canal peut en effet être activé par une multitude de composés allant de molécules électrophiles capables d'interactions covalentes avec des cystéines et lysines de la région pré S1 (comme les allyl isothiocyanate présents dans le wasabi et l'huile

Les astrocytes

de moutarde qui lui valent ainsi le surnom de récepteur au wasabi) à des espèces réactives de l'oxygène en passant par les faibles températures (**Tableau 3**). Historiquement, ce canal fut décrit comme un canal nociceptif exprimé dans les neurones sensitifs des ganglions de la racine dorsale inférieure du nerf vague et trigéminal. Il est également impliqué dans la transduction des signaux sonores au niveau des cellules ciliées de l'oreille interne où il joue le rôle de mécano-senseur (Nagata et al., 2005).

Au niveau de l'encéphale l'expression de TRPA1 n'a été que très peu étudiée. Cependant au niveau du *stratum radiatum* de l'hippocampe, son expression semble être spécifiquement astrocytaire (**Tableau 3**). En effet, des preuves fonctionnelles de son expression astrocytaire ont été apportées grâce aux techniques d'imagerie calcique, d'électrophysiologie, d'ARN interférence et de pharmacologie (Shigetomi et al., 2012a). Une étude récente a mis en évidence la présence de TRPA1 astrocytaire au niveau de l'hippocampe de souris sauvages et transgéniques pour la maladie d'Alzheimer par des techniques de western-blot et d'immunohistochimie (Lee et al. 2016; cette étude sera détaillée dans la partie **2.3.2**).

Les travaux d'Eiji Shigetomi ont permis de mettre en évidence que le canal TRPA1 est responsable de l'apparition d'activités calciques sous membranaires induites par des entrées de calcium extracellulaire. Ces activités ont été détectées sur des astrocytes (d'hippocampe de rat en culture) exprimant une sonde calcique génétique fluorescente adressée à la membrane (Lck-GCaMP3). En parallèle, cette même équipe a mis en évidence l'implication de TRPA1 dans la régulation des niveaux de base du calcium astrocytaire à la fois en culture et sur tranche aigue d'hippocampe de souris au niveau du *stratum radiatum* de la région *CA1*. Enfin leur travail démontre que l'inhibition pharmacologique du canal et la délétion du gène *trpa1* (souris *trpa1*^{-/-}) induit une diminution du transport du GABA par les astrocytes. Cette dérégulation du transport du GABA a pour conséquence une augmentation du GABA extracellulaire capable d'inhiber les interneurones du *stratum radiatum* (Shigetomi et al., 2012b).

Dans une seconde étude en 2013 (Shigetomi et al., 2013a), le même laboratoire a mis en évidence un autre rôle du canal TRPA1 astrocytaire. En utilisant la même sonde (Lck-GCaMP3), ils ont cette fois-ci montré que l'inhibition de TRPA1 bloque le maintien de la potentialisation à long terme (LTP, qui consiste en un protocole de stimulation électrique à haute fréquence des connections synaptiques induisant une réponse *post* synaptique de plus

forte amplitude et maintenue dans le temps). L'apport exogène de D-sérine (un co-agoniste du récepteur NMDA libéré par les astrocytes) permet de rétablir une LTP classique en dépit de l'inhibition de TRPA1. Ceci permet aux auteurs (en complément de mesure des concentrations de D-sérine extracellulaire) de conclure que les activités calciques induites par TRPA1 sont directement impliquées dans les libérations de D-sérine nécessaires à l'établissement et au maintien de la potentialisation à long terme des neurones pyramidaux de l'hippocampe.

Ces deux études présentent donc une dualité d'effets (**Figure 3**), puisque dans le premier cas l'inhibition de TRPA1 rendrait les interneurones moins efficaces et par conséquent les neurones pyramidaux avec qui ils établissent des synapses seraient plus fortement activés (par levée du frein). Dans le second cas, l'inhibition de TRPA1 empêcherait, par manque de D-serine disponible, le renforcement post synaptique des processus de LTP (qui résulte d'une activation synaptique artificielle et soutenue, différente d'une activité physiologique basale) faisant également intervenir les neurones pyramidaux. A l'heure actuelle il apparait donc que le canal TRPA1 interviendrait dans la régulation des activités synaptiques neuronales en amont de mécanismes complexes impactant plusieurs cibles.



💿 Ion calcium 💿 GABA 💿 D-sérine 🌒 TRPA1 📒 GAT-3 🌘 Récepteur NMDA

Figure 3 Schéma récapitulatif des effets de l'inhibition de TRPA1 selon Shigetomi et al. L'Inhibition de TRPA1 (1) a pour effet de diminuer le transport du GABA par GAT-3 (2) et l'excès de GABA extracellulaire inhibe les interneurones, ce qui permet une augmentation de l'activité des neurones pyramidaux avec qui ils établissent des synapses. L'inhibition de TRPA1 induit également une diminution des libérations de D-sérine (2') qui induit une diminution d'efficacité de la LTP.

Tableau 3 Expression, modulateurs, rôles physiologiques et pathologiques des canaux TRPA1. La liste des ligands et modulateurs de TRPA1 est en réalité beaucoup plus importante et ne cesse de s'agrandir, seuls les principaux sont listés dans ce tableau. En vert, sont représentés les ligands et modulateurs activateurs, en rouge, ceux qui inhibent TRPA1 (adapté à partir de Nilius et al. 2012; Fernandes et al. 2012; de Moura et al. 2014).

	Expression (rongeurs et humains)	Perméabilité au ²⁺ Ca ²⁺	Ligands & modulateurs (+ / -)	Pharmacologie & modulateurs validé par publication (+ / -)
TRPA1	Cellules ciliées de l'oreille interne ; cellules entérochromaffines ; cellules du follicule pileux ; kératinocytes indifférenciés ; kératinocytes de la peau ; mélanocytes ; fibroblastes ; urothélium ; endothélium des artères cérébrales et cérébelleuses ; neurones sensitifs des ganglions de la racine dorsal inférieure du nerf vague et trigéminal ; fibres nociceptives C & A∂ ; astrocytes hippocampe (CA1 & DG)	≈ 110 pS $P_{Ca}/P_{monovalents}$ ≈ 5,9 – 7,9 23 % de la fraction des courants Ca	Electrophiles Ca ²⁺ Na ⁺ <i>etc</i> Electrophiles chimiques covalents Allyl isothiocyanate, cinnamaldéhyde, allicine, acroléine, Δ9THC Espèces réactives O ₂ , ROS, RNS, H ₂ S, NO, NOS, O ₃ Prostaglandines InsP6 Non électrophiles lidocaïne, propofol, isoflurane & desflurane Agoniste canaux Ca ²⁺ type L BayK8644, nifédipine, nimodipine, nicardipine, nitrendipine Autres caféine (souris), menthol [faible], Zinc, T<17°C, mécano activation, PKA Xanthine <i>like</i> HC 030031 Monoterpènes camphre Dérivés phtalimides Dérivés caféine (humain) Menthol [forte] T>39°C	AITC (Allyl isothiocyanate) BayK8644 T<17°C HC 030031 A-967079 siRNA et souris KO La ³⁺ Gd ³⁺ T>39°C Ruthenium Red
	Rôles physiologiques		Canalopathie	Autres implications pathologiques
	Thermoception ; nociception ; mér réponses olfactives ; contraction v (froid) ; motilité gastro-intestinale sérotonine ; vasodilatation ; inflar régulation du rythme circadien ; cr niveau de base de Ca2+ astrocyta de GABA et D-sérine ; régulation synaptique à court et moyen term	canoception ; vessie et colon via libération de nmation ; ontrôle du aire ; libération de l'activité es	Syndrome douloureux épisodique familiale (FEPS)	Douleurs inflammatoires, hypersensibilité au froid, douleurs mécaniques, migraines, cancer du rein, érythème, stress oxydatif, arthrose, asthme, maladie d'Alzheimer

1.3.1.5. Canaux anioniques.

Les canaux anioniques comprennent plusieurs familles (Verkhratsky and Butt, 2013). Ne seront détaillés dans cette section que les canaux chlorures (CLC) et les bestrophines.

Les canaux anioniques astrocytaires ne sont que peu décrits, ils semblent cependant intervenir dans la régulation du volume des astrocytes en réponse à un stress osmotique. Plusieurs types de canaux chlorures ont été mis en évidence au niveau astrocytaire *in vitro*, tel que les canaux CLC-1, 2 et 3. Le canal CLC-2 a également été observé *in situ* (Kimelberg et al., 2006).

Parmi les canaux anioniques perméables aux ions Cl⁻, le canal Best-1 (Bestrophine 1) revêt un intérêt particulier. *bestrophine 1*, le gène lié à la dystrophie rétinienne vitelliforme quand il est muté chez l'homme, code également pour l'expression d'un canal anionique transmembranaire activé par le Ca²⁺ au niveau astrocytaire et neuronal dans le système nerveux périphérique (Hartzell et al., 2008; Park et al., 2009). Le canal contient un large pore qui le rend perméable aux grosses molécules telles que le glutamate et le GABA (Lee et al., 2010b; Park et al., 2013). Ce canal a la particularité de s'activer en réponse aux augmentations cytosoliques de calcium astrocytaire et de permettre en retour une libération de glutamate et/ou de GABA (Jo et al., 2014; Woo et al., 2012). Best1 est exprimé majoritairement au niveau des prolongements fins astrocytaires qui sont au contact des synapses glutamatergiques de l'hippocampe de souris (Park et al., 2013). Des études récentes ont mis en évidence son implication dans la régulation de l'activité basale de ces synapses glutamatergiques grâce à l'activation des récepteurs NMDA par le glutamate d'origine astrocytaire (Park et al., 2015) ainsi que dans les déficits de mémorisation chez un modèle de souris transgénique pour la maladie d'Alzheimer (Jo et al., 2014). En effet, dans cette dernière étude utilisant la souris APPswe/PSEN1dE9, il est démontré que les astrocytes réactifs, à proximité des plaques amyloïdes, génèrent une sur-production de GABA. Lorsqu'il sera libéré via Best-1, le GABA induira une diminution de fréquence des EPSC et mEPSC (Excitatoty post synaptic currents & miniature excitatory post synaptic currents). Cette diminution d'activité synaptique affecte la capacité d'apprentissage des souris dans des tests comportementaux faisant intervenir la mémoire spatiale (test de préférence de place conditionnée et de la piscine de Morris).

1.3.1.6. Aquaporines AQPs.

Les aquaporines sont abondamment exprimées par les astrocytes et sont représentées par onze membres chez les mammifères (AQP0 à AQP10). En plus de leur perméabilité aux molécules d'eau, certaines isoformes sont perméables à de petits solutés tels que l'urée et le glycérol.
Elles sont constituées de quatre sous-unités toujours assemblées en homomères. Les aquaporines astrocytaires sont majoritairement retrouvées au niveau du pied péri-vasculaire (on y retrouve notamment l'AQP4 conjointement exprimée avec K_{ir}4.1) et sont impliquées dans la régulation hydrique. Leur activation semble induire le gonflement des astrocytes (par entrée de molécules d'eau) générant un stress mécanique capable d'activer le canal TRPV4, ce qui se traduit par une augmentation de l'amplitude des activités calciques astrocytaires (Mola et al., 2016). L'expression des aquaporines est modifiée dans de nombreux contextes pathologiques tels que l'épilepsie et la maladie d'Alzheimer (Potokar et al., 2016). En effet, l'AQP1 est surexprimée au niveau de l'hippocampe d'un modèle de rats épileptiques et dans le cerveau de patient atteint la maladie d'Alzheimer (Kim et al., 2009; Pérez et al., 2007).

1.3.2. Récepteurs aux neurotransmetteurs.

Les cellules gliales, et plus particulièrement les astrocytes, expriment la même diversité de récepteurs aux neurotransmetteurs que les neurones, ce qui leur permet de prendre part activement à l'activité synaptique. Comme les neurones, les astrocytes expriment donc des récepteurs métabotropiques et ionotropiques (**Figure 4A**).



Figure 4 Récepteurs aux neurotransmetteurs astrocytaires. (**A**) Liste des récepteurs aux neurotransmetteurs et neuromodulateurs astrocytaires. (**B**) Récepteurs métabotropiques et ionotropiques glutamatergiques exprimés par les astrocytes. Signalisation intracellulaire associée aux récepteurs métabotropiques (gauche) et courants entrant associés aux différents récepteurs ionotropiques (droite). (Adapté à partir de Verkhratsky & Butt 2013).

1.3.2.1. Récepteurs glutamatergiques.

Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur principal du SNC chez les mammifères. Les fonctions supérieures telles que l'apprentissage, la mémorisation et la cognition semblent être fortement liées à l'expansion de la transmission glutamatergique (Watkins and Evans, 1981).

1.3.2.1.1. Récepteurs glutamatergiques ionotropiques.

Ces récepteurs sont subdivisés en 3 classes (**Figure 4B**). La première classe est représentée par les récepteurs de types AMPA, activés par l' α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4isoxazolepropionate (AMPA). Ils s'assemblent en 4 sous-unités (GluA1 à 4) pour former un canal à cations perméable aux ions Na⁺ et K⁺. Lorsqu'un récepteur AMPA est dépourvu de la sous-unité GluA2, il devient alors également perméable au Ca²⁺, ce qui participe à l'établissement des phénomènes de potentialisation à long terme (Sah and Mahanty, 1998). Une réorganisation des sous unités AMPA par insertion de sous-unités GluA2 permettra ensuite de mettre en place les phases de consolidation de la potentialisation à long terme (Hardt et al., 2013; Morita et al., 2013). Les astrocytes expriment les récepteurs AMPA dans la plupart des régions du SNC, notamment au sein de l'hippocampe (Martin et al., 1993).

La seconde classe est représentée par les récepteurs au kaïnate (GluK1 à 5). Cette classe de récepteur n'a pour le moment quasiment pas été mise en évidence au niveau astrocytaire, sauf pour les astrocytes du corps calleux (Berger, 1995).

Enfin, la troisième classe est portée par les récepteurs de type NMDA activés par l'acide Nméthyl-D-aspartique (NMDA). Il a longtemps été supposé que ces récepteurs ne pouvaient être exprimés que par les neurones à cause de l'ion Mg²⁺ qui bloque le pore du récepteur. En effet, il est nécessaire pour les neurones d'être suffisamment dépolarisés (\approx -40 mV) pour que l'ion Mg²⁺ libère le canal. Pensant que les astrocytes ne pouvaient être aussi fortement dépolarisés, il a fallu attendre que ce dogme tombe pour que ces récepteurs soient étudiés au niveau astrocytaire. Toutes les sous-unités (GluN1, N2A-D et N3A, B) sont exprimées par les astrocytes (Lee et al., 2010a). Les récepteurs NMDA astrogliaux possèdent certaines particularités par rapport à leurs homologues neuronaux. Premièrement, ils sont beaucoup moins sensibles au blocage par l'ion Mg²⁺. Lorsque les astrocytes sont clampés à -80 mV l'induction de courants NMDA ne dépend pas du Mg²⁺ extracellulaire, le blocage par cet ion ne devient effectif qu'à partir de -120 mV pour les astrocytes (Palygin et al., 2011). Deuxièmement, leur perméabilité au calcium est beaucoup plus faible, avec un ratio $P_{Ca}/P_{monovalents} \approx 3$ alors qu'il est de 10 pour les neurones (Palygin et al., 2011). Enfin, ils possèdent une pharmacologie différente et ne sont, par exemple, que faiblement sensibles à la memantine (Palygin et al., 2011). Le rôle physiologique et l'implication pathologique de ces récepteurs au niveau astrocytaire n'ont, à ma connaissance, pas été décrits dans la littérature depuis leur identification.

1.3.2.1.2. Récepteurs glutamatergiques métabotropiques.

Les astrocytes expriment les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR1 à 8) indépendamment de la région du SNC. Ces récepteurs font partie de la classe des récepteurs à sept domaines transmembranaires et sont représentés par trois groupes distincts (Figure 4B). Les récepteurs mGluR1 & 5 qui font partie du groupe I sont positivement couplés à la phospholipase C, ce qui lorsqu'ils sont activés va augmenter la concentration d'IP₃ et donc conduire à une libération de Ca²⁺ par le réticulum endoplasmique. Les groupes II (mGluR 2 & 3) et III (mGluR4, mGluR6-8) sont couplés à l'adénylate cyclase et régulent, quant à eux, la production d'AMPc. Les astrocytes de l'hippocampe et du cortex expriment majoritairement les formes mGluR3 & mGluR5 ce qui permet aux astrocytes de détecter et réguler activement la transmission synaptique glutamatergique (Panatier and Robitaille, 2016). L'expression astrocytaire des récepteurs mGluR3 et mGluR5 est régulée développementalement (Cahoy et al., 2008; Doyle et al., 2008). Celle de mGluR3 augmente dès les premières semaines postnatales et ce récepteur est exprimé par environ 80 % des astrocytes de l'hippocampe à 3 semaines postnatales chez la souris (Sun et al., 2013). mGluR5 suit une tendance inverse et est exprimé par environ un tiers des astrocytes de l'hippocampe au même âge (Cai et al., 2000). Ces récepteurs métabotropiques sont également mis en jeu lors de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. En culture, il a été mis en évidence une augmentation de la signalisation calcique astrocytaire en présence de concentration nanomolaire du peptide soluble $A\beta_{1-42}$ impliquant une voie de signalisation dépendante de mGluR5 (Lim et al., 2013). En effet, l'inhibition des récepteurs mGluR du groupe I par le DHPG (dihydroxyphenylglycine) permet de réduire significativement l'augmentation d'activité calcique induite par A β_{1-42} . L'expression de ce récepteur est également augmentée à proximité des plaques séniles dans les cerveaux post mortem de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Lim et al., 2013).

1.3.2.2. Récepteurs au GABA (y-aminobutyric acid).

L'équivalent du glutamate pour les synapses inhibitrices est le GABA qui est le neurotransmetteur inhibiteur principal du SNC. De manière comparable aux récepteurs glutamatergiques, il existe deux sous-types de récepteurs gabaergiques, $GABA_{A-C}$ (ionotropiques) et $GABA_B$ (métabotropiques) qui sont exprimés par les astrocytes de quasiment toutes les régions du SNC (**Figure 5**). Fonctionnellement, les récepteurs ionotropiques sont comme pour les neurones, couplés à une conductance chlorure avec pour les astrocytes une nuance apportée par la concentration intracellulaire élevée des ions chlorures (35 mM *vs.* 3-5 mM pour les neurones). En conséquence, l'ouverture des canaux

 $GABA_A$ se traduit par un efflux de Cl⁻ et une dépolarisation cellulaire. L'activation des récepteurs $GABA_A$ inhibe en parallèle les canaux K⁺, facilitant la dépolarisation (Fraser et al., 1994).

L'activation des récepteurs métabotropiques par les libérations neuronales de GABA conduira, quant à elle, à une libération de Ca^{2+} par les stocks calciques dépendants de l'IP₃. Les récepteurs GABA_B astrocytaires sont principalement impliqués dans une forme de plasticité synaptique appelée la dépression hétérosynaptique (Velez-Fort et al., 2012). Cette forme de plasticité concerne les synapses dites inactives localisées à proximité des synapses potentialisées lors de stimulations répétées. Ce phénomène requiert à la fois un mécanisme dépendant des récepteurs NMDA ainsi qu'une activation locale gabaergique des interneurones couplée à des libérations d'ATP astrocytaire. Le blocage des augmentations de calcium dépendantes des récepteurs GABA_B astrocytaire inhibe la dépression hétérosynaptique au niveau de l'hippocampe de rat (Andersson et al., 2007; Serrano et al., 2006).



Figure 5 Représentation schématique de la signalisation gabaergique astrocytaire. (Velez-Fort et al., 2012)

En condition pathologique, les dysfonctionnements impliquant la signalisation gabaergique astrocytaire agissent souvent de concert avec l'apparition d'astrogliose. Ainsi, la signalisation gabaergique astrocytaire est impliquée à travers plusieurs études, portant sur différentes formes d'épilepsie et résulte souvent d'une diminution de cette signalisation ayant pour conséquence un défaut d'inhibition neuronale favorisant l'apparition et la propagation d'activités épileptiques (pour revue voir Robel & Sontheimer 2015). Une étude en 2014 a mis en évidence que cette signalisation pouvait également être impactée lors de la maladie d'Alzheimer (Jo et al., 2014). Ces travaux montrent, chez un modèle de souris transgénique

pour la maladie d'Alzheimer (APPswe/PSEN1dE9) ainsi qu'au niveau de tissus issus de patients atteints de la pathologie, une augmentation de production de GABA astrocytaire révélé par immunomarquage du GABA. Cette surproduction de GABA induirait une forte inhibition neuronale responsable en partie des déficits mnésiques et cognitifs observés chez le modèle de souris transgénique. En effet, l'inhibition de la libération du GABA d'origine astrocytaire, en bloquant l'expression du canal Best-1 par interférence ARN permet de restaurer la mémoire spatiale des souris lors du test de la piscine de Morris.

1.3.2.3. Récepteurs purinergiques.

La signalisation purinergique possède la particularité d'être omniprésente et semble prendre place dans tous les tissus et organes. Cette signalisation, comme nous l'avons décrit précédemment pour la signalisation mettant en jeu les canaux TRPs, est très conservée au sein des espèces et semble être utilisée par tous les organismes vivants (Verkhratsky and Burnstock, 2014). Cette signalisation partage avec TRP une dernière particularité, celle de senseur des dommages cellulaires par l'intermédiaire du relargage d'ATP qui agit comme un signal de danger universel pour les cellules. Ainsi, cette fonction est très importante pour la régulation de nombreux mécanismes de défense cellulaire comme l'astrogliose.

On distingue deux grands types de récepteurs au sein de cette famille, les récepteurs à l'adénosine d'une part et ceux sensibles à l'ATP d'autre part. Les récepteurs à l'adénosine font partie des récepteurs métabotropiques à sept domaines transmembranaires et sont subdivisés en quatre classes (A₁, A_{2A}, A_{2B} et A₃) possédant chacune ses particularités fonctionnelles et pharmacologiques. L'activation des récepteurs A₁ et A₃ exerce un effet global inhibiteur sur l'activité synaptique par l'intermédiaire de 3 mécanismes : (i) l'inhibition de l'adénylate cyclase au travers du couplage des récepteurs à la protéine G_{i/o}, (ii) l'activation de canaux K⁺ et (iii) l'inhibition de canaux Ca²⁺ dépendant du voltage (Burnstock et al., 2011). Les récepteurs A_{2A} et A_{2B} ont un effet activateur sur l'activité synaptique. En effet, leur couplage aux différentes protéines G (G_{S/olf} pour A_{2A} et G_{S/q/12} pour A_{2B}) a pour conséquence la stimulation de production d'AMPc (Burnstock et al., 2011). Les astrocytes expriment tous les types de récepteurs à l'adénosine et sont impliqués à différents degrés dans de nombreuses fonctions physiologiques et pathologiques.

Il a ainsi récemment été mis en évidence que le récepteur A_{2A} était impliqué lors de la maladie d'Alzheimer. Dans cette étude, le laboratoire de Lennart Mucke a décrit une augmentation de l'expression de ce récepteur au niveau des astrocytes de l'hippocampe provenant de cerveaux

post mortem de patients atteints de la maladie (Orr et al., 2015). Cette surexpression du récepteur A_{2A} induirait une trop forte inhibition synaptique et permettrait d'expliquer en partie les déficits cognitifs observés pour les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Dans la même étude, ils ont également mis en évidence sur un modèle de souris transgénique exprimant le précurseur de la protéine amyloïde (hAPP) que l'élimination génétique du récepteur A_{2A} permettait de rétablir les performances des souris lors du test de la piscine de Morris.

Les récepteurs purinergiques sensibles à l'ATP incluent des récepteurs ionotropiques (P2X_{1.7}) et métabotropiques (P2Y_{1, 2, 4, 5, 6, 8-14}, les numéros manquants proviennent de la confusion au moment du clonage de certains récepteurs qui se sont révélés ne pas être du type P2Y). Les récepteurs P2X constituent des canaux cationiques classiques et leur activation conduit à la création d'un courant dépolarisant principalement porté par les ions Ca²⁺ et Na⁺. Le récepteur P2X₇ astrocytaire semble être impliqué, selon deux études distinctes, dans l'initiation du clivage de la protéine APP en un fragment neuro-protecteur (sAPP α), ce qui aurait pour effet de diminuer le nombre de plaques amyloïdes chez des modèles de souris transgéniques (Darmellah et al., 2012; Diaz-Hernandez et al., 2012). La première étude décrit ce mécanisme comme la conséquence de l'activation de P2X₇ tandis que la seconde le décrit comme étant la conséquence de son inhibition. En dépit de certaines contradictions, il est globalement admis que les récepteurs P2X font partie intégrante du fonctionnement astrocytaire en physiologie et pathologie.

La seconde classe, celle des récepteurs purinergiques métabotropiques est très représentée au niveau astrocytaire, les plus abondants étant les sous-types $P2Y_{1, 2 \text{ et } 6}$ (Fields and Burnstock, 2006). Les récepteurs P2Y sont positivement couplés à la phospholipase C (PLC) et leur activation permet donc une élévation du Ca²⁺ intracellulaire *via* les stocks calciques dépendants de l'IP₃.

Un emballement de l'activité calcique astrocytaire impliquant $P2Y_1$ a d'ailleurs été observé au niveau du cortex somatosensoriel de la souris transgénique pour la maladie d'Alzheimer APP/PS1-21 (Delekate et al., 2014). Dans cette étude, il a été mis en évidence une hyperactivité calcique des astrocytes à proximité des plaques amyloïdes. Cette hyperactivité est médiée par une transmission purinergique et l'inhibition du récepteur P2Y₁ ainsi que le découplage des jonctions *gaps* (afin de bloquer la transmission paracrine de l'ATP) permettent de normaliser l'activité calcique astrocytaire. Cette étude place donc la

42

signalisation purinergique comme une cible privilégiée des dysfonctions du réseau astrocytaire observée dans les phases tardives de la maladie d'Alzheimer (cette étude sera traitée plus en détail dans la partie **2.3.2**).

1.3.2.4. Autres types de récepteurs aux neurotransmetteurs.

Les récepteurs les plus classiquement décrits ou les plus fréquemment impliqués dans les maladies neurodégénératives ont été présentés ci-dessus. Cependant, au regard de leur implication dans le fonctionnement du SNC et de leur diversité, les astrocytes expriment pléthore de récepteurs aux neurotransmetteurs. Ainsi, ces cellules sont également impliquées dans la signalisation adrénergique, acétylcholinergique, glycinergique, sérotoninergique, dopaminergique et histaminergique. Ils expriment aussi les récepteurs aux : endocanabinoïdes, neuropeptides, cytokines, du complément, de la thrombine, des éphrines, du facteur d'activation plaquettaire et du succinate (pour plus de détails voir Verkhratsky & Butt 2013). Cette longue liste de modulateurs de l'activité astrocytaire et par extension de l'activité synaptique, est probablement loin d'être complète et sera sans doute amenée à évoluer encore.

1.3.3. Transporteurs et échangeurs astrocytaires.

1.3.3.1. Transporteurs

Parmi les protéines résidant au niveau membranaire on trouve également les transporteurs impliqués dans la recapture, le recyclage et les libérations de neurotransmetteurs (**Figure 6**).

Les astrocytes expriment deux sous-types de transporteurs au glutamate parmi les cinq soustypes existant, GLT-1 et GLAST. Le transport du glutamate est électrogénique et nécessite l'import de 3 Na⁺ et la sortie d'un K⁺. Ainsi, l'activité des transporteurs au glutamate astrocytaire est enregistrable par les techniques d'électrophysiologie classiques comme le patch-clamp et se traduit par l'apparition d'un courant entrant. Cette activité des transporteurs au glutamate concerne la fonction de recapture du glutamate par les astrocytes. En effet, il n'existe pas de système dans le compartiment extracellulaire capable de dégrader le glutamate. De plus, s'il est présent en trop forte concentration, le glutamate devient toxique et conduit à la mort neuronale (Tzingounis and Wadiche, 2007; Vandenberg et al., 2013). En plus d'une simple diffusion passive, le seul moyen de le retirer de l'espace extracellulaire est donc la présence de transporteurs. Au-delà du rôle de recapture, il a été montré que la régulation fine des quantités de glutamate au niveau synaptique peut-être régulée par GLT-1 (Murphy-Royal et al., 2015). Dans cette étude, le groupe de Stéphane Oliet à Bordeaux a

montré, grâce à la technique du suivi de nanoparticule unique (qui consiste à coupler dans ce cas GLT-1 avec un quantum dot afin de pouvoir suivre sa diffusion membranaire) que la diffusion de ce transporteur était fortement diminuée à proximité des synapses glutamatergiques et dépendante de l'activité synaptique. Leur hypothèse est donc que GLT-1 serait en compétition avec les récepteurs glutamatergiques neuronaux afin de finement réguler la quantité et le temps de disponibilité du glutamate au niveau synaptique. Cette hypothèse pourrait donc être en lien avec les diminutions d'expression de GLT-1 observées par différents groupes dans le cerveau d'animaux transgéniques et de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Li et al. 1997; Francis 2003; Jacob et al. 2007). Cette diminution d'expression de GLT-1 participerait aux augmentations de concentration du glutamate extracellulaire devenant ainsi neurotoxique.

En ce qui concerne le GABA, il existe 4 sous-types de transporteurs GAT-1 à 4 (pour GABA transporter). Les astrocytes expriment principalement GAT-3 (Conti et al. 2004). Comme nous l'avons vu dans la partie **1.3.1.4**, GAT-3 est impliqué au niveau des synapses de l'hippocampe dans la régulation de l'activité des interneurones et indirectement des neurones pyramidaux (Shigetomi et al., 2012b).

On retrouve également exprimés au niveau astrocytaire les transporteurs de la glycine (GlyT), qui est également un neurotransmetteur inhibiteur, mais peu présent au niveau de l'encéphale alors qu'il est abondant au sein de la moelle épinière (Zafra et al., 1995). Le rôle de ce transporteur permettrait de maintenir des concentrations non saturante de glycine afin de réguler le niveau d'excitabilité de la transmission glutamatergique (Bergeron et al., 1998; Tsai et al., 2004; Martina et al., 2005).

Les trois types de transporteurs décrits dans cette partie sont associés au co-transport du Na⁺, ce qui a pour effet d'augmenter la concentration intracellulaire de Na⁺. Les astrocytes expriment en plus de ces transporteurs, des échangeurs basés sur l'homéostasie sodique, tels que les transporteurs Na⁺/HCO3⁻ (NBC) qui contribuent à la régulation du pH (Rose, 2010). Sont également exprimés les transporteurs Na⁺/K⁺/Cl- (NKCC) impliqués dans l'homéostasie potassique extracellulaire (Verkhratsky and Butt, 2013).

1.3.3.2. Echangeur sodium / calcium.

Il sera décrit par la suite l'importance des signalisations sodique et calcique pour les astrocytes. L'homéostasie de ces deux ions est cruciale et l'astrocyte possède un outil

particulier à l'interface de ces deux voies de signalisation, l'échangeur sodium/calcium (NCX).

Chez les mammifères, il existe trois isoformes de ces échangeurs (NCX 1 à 3) qui sont toutes retrouvées au niveau astrocytaire. Ils sont localisés principalement au niveau de la membrane des prolongements astrocytaires périsynaptiques recouvrant les synapses excitatrices (Minelli et al., 2007). Les NCX sont impliqués à la fois dans l'extrusion et l'entrée des ions Ca²⁺ et Na⁺ (3 Na⁺ pour 1 Ca²⁺) car ces échangeurs possèdent deux modes de fonctionnement dits « normal » et « inverse ». Le choix du mode de fonctionnement est déterminé par le gradient transmembranaire de Na⁺ et le potentiel membranaire (l'augmentation du Na⁺ et la dépolarisation favorisent le mode inverse et *vice versa*). Ainsi, il n'est pas étonnant de retrouver cet échangeur colocalisé avec GLT-1 et les récepteurs NMDA qui sont tous deux associés à des mouvements de Na⁺ (Minelli et al., 2007). Toutefois, il a également été démontré que le mode inverse fonctionne à l'état de repos sur culture d'astrocyte corticaux de rat (Reyes et al., 2012). Cette même étude démontre que les NCX permettent, en mode inverse, de moduler l'exocytose du glutamate astrocytaire.

Les différents transporteurs astrocytaires sont donc des acteurs cruciaux du fonctionnement physiologique des astrocytes et pourraient potentiellement être impliqués dans certaines maladies neurodégénératives.



Figure 6 Représentation schématique des transporteurs astrocytaires et de leurs fonctions principales. (i) Pompe sodium/potassium. (ii) Co-transporteur sodium/potassium/chlorure. (iii) Transporteur du glutamate. (iv) Transporteur du GABA. (v) Canaux sodiques (ENac: canaux sodiques épithéliaux). (vi) Echangeur sodium/calcium. (vii) Pompe sodium/proton. (viii) Co-transporteur sodium/bicarbonate. (ix) Transporteur monocarboxylate. (x) Echangeur sodium/calcium mitochondrial. (Adapté à partir de Kirischuk et al. 2012).

1.3.4. Jonctions communicantes et hémicanaux.

Les astrocytes disposent de nombreux niveaux de régulation de signalisation soutenus par les canaux ioniques, les récepteurs et les transporteurs qu'ils expriment. S'ajoute à ces premiers niveaux celui d'un fonctionnement en réseau des astrocytes, on parle du *syncytium* astrocytaire. Ce réseau, qui s'organise en différents territoires exclusifs, est porté par la présence de jonctions communicantes entre les astrocytes.

1.3.4.1. Jonctions communicantes.

Les jonctions communicantes cellulaires de type gap sous-tendent le couplage astrocytaire et permettent des échanges métabolique et ioniques (Giaume, 2010). Ces jonctions sont formées par l'apposition de deux connexons. Chaque connexon résulte de l'assemblage de 6 protéines appelées connexines dont il existe 21 sous-types chez l'homme et 20 chez la souris. Les connexines 30 (Cx 30) et 43 (Cx 43) sont celles que l'on retrouve exprimées majoritairement au niveau astrocytaire chez l'adulte (pour revue voir Theis & Giaume 2012). Le pore d'un connexon permet de laisser passer des molécules dont le poids moléculaire n'excède pas 1,5 kDa. Ainsi, peuvent transiter par ce pore des ions et des petites molécules (K^+ , Ca^{2+} , glucose etc.) mais également des molécules de signalisation comme le glutamate, l'ATP et l'IP₃. Ce mécanisme permet, par exemple, la redistribution du potassium après sa recapture par les astrocytes (Scemes and Spray, 2012) permettant de préserver l'osmolarité cérébrale. En 2000, l'identification d'une autre famille de gènes codant pour trois protéines nommées pannexines (Panx 1 à 3) a complété cette famille de canaux (Panchina et al., 2000). Les pannexines comme les connexines, peuvent s'assembler en pannexons, également composés de 6 pannexines, et participer à la signalisation paracrine astrocytaire. Comme pour les connexons, l'ouverture du pore des pannexons est un phénomène qui peut-être régulé par le calcium (Giaume et al. 2013).

Le couplage par les jonctions communicantes est un processus dynamique qui est régulé de différentes manières, telles que l'activité neuronale (Marrero and Orkand, 1996), l'augmentation de la concentration du potassium extracellulaire (Kristian Enkvist and McCarthy, 2002) ou lors de contextes pathologiques (Mei et al., 2010; Theis and Giaume, 2012). Le groupe de Nathalie Rouach a particulièrement étudié la régulation de l'activité synaptique par la connexine 30 (Pannasch et al., 2014). Au niveau de l'hippocampe d'une souche de souris $Cx30^{-/-}$, la transmission synaptique glutamatergique mesurée par la méthode du patch-clamp se trouve significativement réduite. La LTP est également moins efficace dans

cette lignée de souris. Cette étude propose que la délétion de la connexine 30 induise une augmentation de la recapture du glutamate par GLT-1 et par conséquent une transmission synaptique moins efficace. La délétion de la connexine 30 permettrait aux prolongements astrocytaires de s'immiscer plus profondément au cœur de la synapse, permettant alors à GLT-1 (qui est enrichi au niveau de ces prolongements) une recapture aberrante du glutamate.

Récemment, il a été mis en évidence que les connexines et pannexines ne s'organisaient pas obligatoirement en doublet de connexons et pannexons pour former des jonctions de type gap. En effet, ces structures peuvent rester à l'état d'hémicanaux, établissant un contact direct entre le cytosol des cellules et l'espace extracellulaire.

1.3.4.2. Hémicanaux.

Les hémicanaux les plus représentés au niveau astrocytaire sont composé des connexines 43 et des pannexines 1. Ces éléments forment des pores transmembranaires capables de libérer la même gamme de molécules que les jonctions de type gap dans le milieu extracellulaire. Cette particularité leur confère la capacité d'établir des communications autocrines et paracrines. Ainsi, leur rôle physiologique (probablement vaste) intervient par exemple dans la régulation de la signalisation purinergique durant le développement, la régulation des concentrations de glucose au niveau de l'hypothalamus, la vision, la régulation de l'activité synaptique et les phénomènes d'apprentissage et de mémorisation par l'intermédiaire de libération de neurotransmetteurs (pour revue voir Giaume et al. 2013; Cheung et al. 2014; Montero & Orellana 2015).

Ces différents rôles les impliquent en parallèle dans différentes maladie neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer. Des astrocytes en culture en présence du peptide A β_{25-35} révèlent une augmentation des libérations de glutamate et d'ATP par les hémicanaux formés par la Cx 43 (Orellana et al., 2011a). Ces libérations de glutamate et d'ATP ont pour effet l'activation des récepteurs NMDA et P2X₇ ainsi que l'ouverture des pannexons formés par Panx1 au niveau neuronal. La conséquence finale de l'activation de ces 3 acteurs serait une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire, conduisant à la mort neuronale et à la progression de la pathologie.

D'autres études, décrivent une augmentation de l'expression des connexines 30 et 43 astrocytaires dans des modèles de souris transgénique ($APP_{swe}/PS1_{dE9}$) et chez des patients atteints de formes familiales de la maladie d'Alzheimer (Koulakoff et al., 2012; Mei et al., 2010). Plus récemment, une étude réalisée sur tranches aigues d'hippocampes de souris, a mis

en évidence que cette augmentation d'expression n'impactait pas la communication dépendante des jonctions gap, mais impactait les hémicanaux formés par ces connexines (Yi et al., 2016). Les hémicanaux constitués de pannexines 1, dans une plus faible mesure, sont également mis en jeu. L'activité augmentée de ces hémicanaux, en présence de plaques amyloïdes, est dépendante des processus inflammatoires et de l'augmentation des concentrations de calcium astrocytaire. Ces modifications induisent une libération excessive d'ATP et de glutamate par les astrocytes qui contribuent à augmenter le calcium astrocytaire, les plaçant ainsi dans un cercle vicieux. La délétion du gène pour la Cx 43 (APP/PS1 Cx43 KO), permet, dans cette étude, de contrer ces effets et de diminuer les atteintes neuronales dans ce modèle de souris transgénique pour la maladie d'Alzheimer.

1.4. Signalisation intracellulaire astrocytaire.

1.4.1. La signalisation calcique astrocytaire.

Depuis les travaux d'Ann Cornell-Bell en 1990 et l'avènement de l'imagerie calcique, il a été progressivement admis que les astrocytes possèdent une forme d'excitabilité particulière portée par des variations de la concentration de calcium libre intracellulaire. Les principes généraux de cette signalisation seront décrits dans cette partie.

1.4.1.1. Les sources du calcium astrocytaire.

L'ion calcium est un second messager ubiquitaire et universel, impliqué, de fait, dans un large panel de fonctions. Les astrocytes disposent de deux sources de calcium (**Figure 7**), l'une extracellulaire considérée comme illimitée de par sa concentration de l'ordre du millimolaire, la seconde intracellulaire, localisée au niveau du réticulum endoplasmique, avec une concentration comprise entre 300 et 800 µM pour les astrocytes (Verkhratsky and Butt, 2013). L'entrée de calcium en provenance du milieu extracellulaire est prise en charge par les canaux calciques dépendants du voltage, les récepteurs ionotropiques associés à une conductance calcique, des canaux cationiques de la famille des TRPs, l'échangeur sodium/calcium et des canaux activés par la déplétion des stocks internes. La libération de calcium à partir du réticulum passe par l'activation de deux types de canaux intracellulaires, les récepteurs à l'IP₃ et ceux sensibles à la ryanodine (RyR) (Berridge et al., 2003).



Figure 7 Les différentes sources du calcium astrocytaire. En condition physiologique, l'ouverture des canaux membranaire ou intracellulaire induit un influx de calcium selon le gradient de concentration. Ces influx de calcium peuvent activer le réticulum endoplasmique qui libérera à son tour du calcium de façon importante et diffuse pouvant conduire à la libération vésiculaire de transmetteurs appelés gliotransmetteurs. La mitochondrie a la capacité de tamponner le calcium intracellulaire par l'intermédiaire d'uniporteur. Il existe dans l'espace intracellulaire des protéines de liaison du calcium qui régulent également la concentration de calcium libre. L'échangeur sodium/calcium et la pompe PMCA permettent quant à eux une extrusion du calcium vers le milieu extracellulaire. Abréviations : CBP *calcium binding protein*, ER *endoplasmic reticulum*, GLT *glutamate transporter*, GPCR *G-protein coupled receptor*, LGCC *ligand gated Ca*²⁺ *channel*, NCX Na⁺/Ca²⁺ *exchanger*, PMCA *plasmalemmal* Ca²⁺ *ATP-ase*, RyR *ryanodine receptor*, SOC *store operated* Ca²⁺ *channel*, SOCE *store operated* Ca²⁺ *entry*. Adapté à partir de (Verkhratsky and Butt, 2013).

Ces récepteurs participent à un phénomène régénératif des mouvements de calcium par l'intermédiaire d'un processus appelé Ca^{2+} *induced* Ca^{2+} *release* (CICR). Les récepteurs de la ryanodine et de l'IP₃ sont activés par une augmentation de calcium libre cytosolique qui exerce alors un rétrocontrôle positif sur leur activation et participe ainsi au phénomène régénératif qui permet la propagation de la signalisation au sein d'une cellule, de proche en proche (**Figure 8**). Cependant, lorsque la concentration de calcium devient trop élevée, l'effet du calcium inhibe les récepteurs RyR et IP₃. Lors de ces contextes d'excès de calcium intracellulaire, des systèmes d'extrusion fonctionnant contre le gradient de concentration du calcium se mettent en place, comme la pompe PMCA (*plasmalemmal Ca²⁺ ATP-ase*) et l'échangeur sodium/calcium (NCX). Au niveau du réticulum la pompe SERCA (*sarcoplasmic reticulum ATP-ase*) permet la recapture lors des fortes augmentations de Ca²⁺ (Berridge et al., 2003). Ainsi, ces différents outils associés aux protéines tampon (telles que les calmodulines) permettent une régulation fine de la concentration intracellulaire de calcium libre, avec pour

finalité de restreindre les phénomènes de toxicité en n'ayant de cesse de tamponner, extruder ou recapter cet ion.



Figure 8 Mécanismes régénératif de la propagation du calcium depuis le réticulum endoplasmique. (**A**) Le relargage du Ca²⁺ depuis le réticulum endoplasmique est relayé par deux acteurs, les récepteurs à l'IP₃ et les récepteurs à la ryanodine. (**B**) L'activation des récepteurs à l'IP₃ et RyR induit une augmentation locale du calcium qui active en retour les canaux à proximité produisant ainsi une vague régénérative de calcium. (Verkhratsky and Butt, 2013).

1.4.1.2. Les territoires astrocytaires et la compartimentation de la signalisation calcique astrocytaire.

Comme il a été décrit dans la partie **1.3.4**, les astrocytes *via* les jonctions de type gap, s'organisent en *syncytium*. Cette organisation est mise en jeu lors de la propagation des vagues calciques dans les astrocytes en culture. Ces vagues calciques représentent une manifestation particulière de l'activité calcique astrocytaire, relayée par le mécanisme régénératif décrit dans la partie précédente et par diffusion d'IP3 et d'ATP (provoquant également une libération d'IP3) au travers des jonctions *gap* (Hassinger et al., 1996; Venance et al., 1995). Ces vagues calciques peuvent également être déclenchées par la stimulation mécanique du réseau astrocytaire en culture aboutissant à des libérations vésiculaires de glutamate (Araque et al., 1998a). Les vagues calciques ont longtemps été considérées comme un artéfact lié à la mise en culture d'astrocytes, jusqu'à leur mise en évidence sur tranche aigue de cerveau et *in vivo* (mais de manière beaucoup plus restreinte spatialement qu'*in vitro*) par différents groupes (Fiacco et al., 2009; Nimmerjahn et al., 2009). Une étude en 2011 a décrypté un autre mécanisme de propagation d'évènements calciques appelé *glissandi*

au niveau de l'hippocampe in vivo (Kuga et al., 2011). Ce phénomène recrutant successivement plusieurs astrocytes semble plus rapide qu'in vitro (60 µm/s vs. 10-20 µm/s in *vitro*) et dépend de l'activité neuronale puisque l'apparition des glissandi est totalement abolie en présence de TTX (tétrodotoxine, inhibiteur des canaux sodiques dépendants du voltage). Une seconde étude, issue du même laboratoire la même année, a décrit en parallèle un mécanisme de synchronisation des activités calciques au niveau du néocortex et de l'hippocampe in vivo (Sasaki et al., 2011). Dans cette étude, le phénomène de propagation est moins évident que dans la précédente puisque les activités calciques des astrocytes sont synchronisées et semblent apparaitre simultanément au sein de clusters d'astrocytes. Ces clusters d'activités regroupent entre 2 et 5 astrocytes dispersés sur une centaine de micromètres (81 \pm 45 μ m). A la différence des glissandi, cette synchronie est totalement indépendante de l'activité neuronale et semble être médiée par les récepteurs glutamatergiques métabotropiques astrocytaires. Certains auteurs considèrent la synchronie des activités calciques astrocytaires comme l'équivalent des vagues calciques retrouvées en cultures. Il est donc proposé que ce mode de propagation puisse agir comme une communication inter-astrocytaire capable de réagir, ou non, à l'activité neuronale environnante.

Ainsi, il a été mis en évidence une synchronie astrocytaire relayée par les jonctions gap (constituées de Cx 43) calquée sur la synchronie du réseau neuronal lors d'un contexte d'activités neuronales épileptiformes (Kékesi et al., 2015). Dans cette étude, cette synchronie astrocytaire participe à la propagation des activités épileptiques, car son inhibition, lorsque les jonctions gap sont découplées, diminue la propagation des activités neuronales épileptiformes.

S'il apparait que les activités calciques astrocytaire puissent être coordonnées au sein d'un réseau, il existe également une compartimentation des activités calciques au sein d'un astrocyte unique.

La majorité des études portant sur l'excitabilité calcique astrocytaire s'est, dans un premier temps, focalisée sur les activités somatiques car elles étaient techniquement accessibles. Cependant dès 1999, le groupe d'Helmut Kettenmann a mis en évidence dans les prolongements astrocytaires au niveau de la glie de Bergmann, la présence de réponses calciques évoquées par la stimulation des fibres parallèles (neuronales) survenant de manière localisée et indépendamment de l'activité du soma (Grosche et al., 1999). La notion de microdomaines fonctionnels comme substrat des interactions neurone-glie a émergé de cette

étude. L'hypothèse de l'existence de microdomaines fut renforcée par la découverte de l'organisation du réseau de prolongements fins astrocytaires en domaines indépendants, ne se recouvrant pas (ou très peu) (Bushong et al., 2002). En 2002, ces observations structurales furent corroborées par des données fonctionnelles obtenues en tranche aigue au niveau d'astrocytes hippocampiques de la région *CA1* (Nett et al., 2002). Ce travail représentera une avancée majeure dans l'étude des activités calciques astrocytaires. D'une part, l'utilisation détournée de la méthode du patch-clamp pour délivrer un indicateur calcique directement dans le compartiment intracellulaire d'un astrocyte unique fut une avancée technique majeure, puisqu'elle permet l'étude fonctionnelle de l'arborisation astrocytaire à l'échelle d'une cellule unique. D'autre part, cette étude venait confirmer l'existence d'une compartimentation des activités calciques astrocytaire complexe et évoluée.

Cependant, il aura fallu attendre une décennie supplémentaire pour que ces activités compartimentées soient plus amplement investiguées (Di Castro et al., 2011; Panatier et al., 2011). L'étude des activités calciques dans les prolongements, au travers de différents travaux, a révélé une activité beaucoup plus fréquente qu'au niveau somatique et très localisée (quelques μ m), finement régulée et généralement indépendante des activités somatiques (**Figure 9**).



Figure 9 Diversité des activités calciques astrocytaires au niveau de l'hippocampe de souris adultes. (A) Activités calciques cumulées enregistrées pendant 165 s et révélées par l'indicateur calcique Fluo4-AM. L'intensité, exprimée en unité arbitraire, des activités est plus importante au niveau somatique que dans les prolongements. (B) Carte de fréquence des activités sur 165 s mesurée pour chaque pixel et exprimée en mHz. On note qu'à l'inverse des intensités, les fréquences sont beaucoup plus élevées au niveau des prolongements. (C) Carte spatiotemporelle démontrant que les activités sont asynchrones. (D) Représentation schématique de la diversité des activités calciques au sein d'un même astrocyte. D'après (Volterra et al., 2014).

A cette diversité de signaux calciques, s'ajoute un second niveau de complexité mis en évidence par le groupe d'Andrea Volterra (Di Castro et al., 2011). Cette étude, à l'aide de la technique du chargement d'un indicateur calcique par la pipette de patch-clamp, a mis en évidence l'existence de deux sous-types d'activités calciques au niveau des prolongements proximaux de l'arborisation astrocytaire du *gyrus denté* sur des tranches de cerveau de souris. Dans cette étude, l'arborisation proximale d'un astrocyte a été scindée en plusieurs microdomaines fonctionnels d'1 μ m² chacun. Ainsi, un premier type d'activité, nommée focale, fut décrit. Ces activités sont indépendantes des potentiels d'action, confinées sur environ 1 à 4,2 μ m et durent environ 700 ms. Le second type d'activité, nommée *expanded* (étendue), se propage sur plusieurs microdomaines (environ 12,9 μ m), dure plus longtemps que les activités focales (environ 3,2 s) et semble être dépendante des potentiels d'action.

Plus récemment, le développement de sondes génétiques du calcium particulières (genetically encoded calcium indicator, GECI) a permis de confirmer cette compartimentation de la signalisation calcique dans les prolongements fins astrocytaires (Shigetomi et al., 2013b) et a permis, notamment, de mettre en évidence que ces activité sont nécessaires à la mise en place des processus de LTP grâce aux libérations de D-sérine astrocytaire comme nous l'avons décrit précédemment (Shigetomi et al., 2013a).

La question des acteurs moléculaires impliqués dans la signalisation calcique des prolongements astrocytaires n'est pour le moment pas clairement élucidée. Le groupe d'Andrea Volterra propose que l'origine du calcium impliqué dans ces activités soit principalement intracellulaire en mettant en jeu le récepteur à l'IP₃ de type 2 (IP₃R2). En effet, la délétion de ce récepteur entraîne la disparition d'environ 80 % des évènements focaux et 90 % des évènements étendus. A contrario, d'autres auteurs proposent que des entrées de calcium extracellulaire soient principalement impliquées dans la genèse de ces activités. Dans ces études, la déplétion du calcium externe et/ou interne et l'inhibition de canaux et récepteurs responsables d'élévations du Ca²⁺ intracellulaire tels que TRPA1 et mGluR, induisent de très fortes diminutions des activités calciques au niveau des prolongements astrocytaires indépendamment des récepteurs à l'IP₃ (Shigetomi et al. 2012b; Shigetomi et al. 2013; Nakayama et al. 2016; Rungta et al. 2016). Une étude de microscopie électronique portant sur la localisation des stocks calciques astrocytaires propose que les prolongements fins distaux soient dépourvus de réticulum endoplasmique car trop fins pour permettre à ces organites d'y être présents (Patrushev et al., 2013). Ces divergences sont cependant probablement réconciliables, d'une part par des spécificités dues à la localisation des astrocytes (gyrus denté pour le groupe d'Andrea Volterra et CA1 pour les autres études), et d'autre part, car il n'est pas impossible que les deux sources de calcium (interne et externe) fonctionnent de concert, étant donné qu'aucune de ces études n'obtient d'abolition totale des signaux calciques. En effet, une part d'activité résiduelle persiste malgré les stratégies de délétion génétique et/ou de déplétion calcique.

Un dernier acteur décrit précédemment possède également les caractéristiques nécessaires pour l'impliquer dans l'initiation de ces activités calciques. Il s'agit de l'échangeur sodium/calcium NCX. En mode inverse, cet échangeur induit une sortie d'ions Na⁺ et une entrée de Ca²⁺. Ainsi, il n'est pas improbable qu'à la suite d'activités neuronales induisant l'ouverture de canaux astrocytaires permettant une entrée de Na⁺ (lors de la recapture du glutamate par GLT-1 par exemple), ce canal passe en mode inverse pour réguler l'homéostasie sodique, induisant en retour des entrées de Ca²⁺. Il est également concevable qu'il soit directement impliqué dans la régulation des activités calciques des prolongements et que son mode de fonctionnement soit dépendant de sa localisation cellulaire (ce point sera détaillé dans la discussion).

1.4.2. Les autres supports de l'excitabilité astrocytaire.

En parallèle du calcium, d'autres molécules et seconds messagers sont impliqués dans la signalisation astrocytaire. Cependant, jusqu'à très récemment, la majorité des études portaient sur la signalisation calcique tout en mentionnant l'importance potentielle de la signalisation sodique et du rôle particulier de l'AMP cyclique. Cette partie sera en conséquence focalisée sur la signalisation sodique, après un exemple de la mise en jeu de la signalisation utilisant l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) qui fonctionne souvent de pair avec la signalisation calcique.

Par l'intermédiaire des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G, les astrocytes sont en mesure d'utiliser l'AMPc comme second messager. L'activation de la sous-unité G_s de ces récepteurs permet de stimuler l'enzyme adenylate cyclase, qui catalyse la conversion d'ATP en AMPc (Vardjan and Zorec, 2015).

Il a été récemment mis en évidence que l'activation des récepteurs β-adrénergiques entraîne une augmentation de la concentration d'AMPc induisant la stellation (passage d'une forme polygonale à une forme étoilée et présentant des prolongements) des astrocytes en culture (Vardjan et al., 2014). Récemment, il a été mis en évidence au niveau de l'hippocampe de souris des activités calciques oscillatoires (sous forme de pics d'activité calcique successifs à intervalles réguliers) impliquant le récepteur IP₃R2 et l'AMPc (Ujita et al., 2016). Ces activités oscillatoires semblent être favorisées lors de contextes pathologiques, telles que les activités épileptiformes ou lors de carence énergétique (résultant d'une ischémie cérébrale par exemple). Ainsi, l'AMPc semble être impliqué dans un large spectre de fonctions, passant par des modifications à la fois morphologiques et fonctionnelles concernant l'activité calcique astrocytaire. On peut donc imaginer que cette signalisation soit importante dès les phases du développement astrocytaire et jusqu'aux contextes pathologiques (Verkhratsky and Butt, 2013).

La concentration de sodium astrocytaire, comme celle du calcium et d'AMPc, varie de manière physiologique suite à l'activation de différents acteurs afin de participer à la régulation de nombreuses fonctions astrocytaires. La concentration cytosolique au repos de sodium astrocytaire est plus importante que celle de l'ion calcium et est estimée à 15 mM (Rose and Verkhratsky, 2016). Comme pour la signalisation calcique, des vagues sodiques ont été observées suite à la stimulation électrique d'astrocytes sur tranches aigues d'hippocampes (Langer and Rose, 2009).

Les entrées de Na⁺ astrocytaire se font par l'intermédiaire de canaux, transporteurs et échangeurs (listés **Figure 6**). Parmi ces acteurs, les canaux TRPC (1 à 3) qui sont très fortement exprimés par les astrocytes permettent une régulation fine de la concentration de sodium (Golovina, 2005). Grâce à leur implication conjointe dans des mécanismes d'entrée du calcium dépendante des stocks internes et à leur conductance sodique, ces canaux établissent un lien entre les mouvements de calcium et les entrées de sodium. En effet, la déplétion de calcium du réticulum endoplasmique entraine l'activation des canaux TRPC et par conséquent une augmentation de la concentration du sodium intracellulaire suite à l'ouverture du canal pouvant être responsable de libération de glutamate par les astrocytes (Malarkey et al., 2008; Verkhratsky and Parpura, 2014).

Un autre acteur, présenté précédemment, établit également un lien entre la signalisation calcique et sodique, l'échangeur sodium/calcium NCX. Les fluctuations dynamiques entre le mode normal et inverse de cet échangeur participent à la régulation de la signalisation calcique et sodique astrocytaire. Dû à la forte concentration intracellulaire d'ions Na⁺, le potentiel d'inversion des NCX est proche du potentiel membranaire de repos astrocytaire. Ainsi, la recapture du glutamate induit dans un premier temps une entrée de calcium dépendante des NCX, puis dans un second temps, en réponse à l'augmentation de Ca²⁺ intracellulaire, les NCX basculeront en mode normal afin de rétablir le gradient sodique (Kirischuk et al., 1997). Comme pour le calcium, la stimulation électrique d'afférences neuronales peut déclencher une augmentation de la concentration gap formant le syncytium astrocytaire en cultures et sur tranches aigues d'hippocampe (Bernardinelli et al., 2004; Langer et al., 2012).

La signalisation sodique est impliquée dans différentes fonctions physiologiques telles que : la recapture du glutamate et du GABA qui sont dépendantes du gradient transmembranaire du sodium, l'homéostasie potassique par l'intermédiaire des co-transporteurs $Na^+/K^+/Cl^-$ NKCC1, le soutien métabolique *via* l'activation Na^+ dépendante de la pompe Na^+/K^+ ATPase qui initie le transport du lactate entre astrocytes et neurones et également la régulation du pH intracellulaire puisque la concentration de Na^+ module directement le système de transport H⁺/OH⁻/HCO₃⁻ (pour revue voir Kirischuk et al. 2012; Rose & Verkhratsky 2016).

La signalisation sodique, comme la signalisation calcique, semble donc idéalement placée pour coordonner l'activité neuronale et astrocytaire, particulièrement au niveau des prolongements périsynaptiques astrocytaires où les acteurs de cette signalisation sont localisés préférentiellement.

1.5. Principales fonctions astrocytaires.

Les fonctions astrocytaires englobent un large spectre de régulations homéostatiques et de maintien de la physiologie du SNC. Certaines de ces fonctions primordiales, mais éloignées des travaux présentés dans ce manuscrit, ne seront qu'évoquées dans cette sous-partie.

1.5.1. Neurogénèse et gliogénèse.

Très tôt au cours du développement embryonnaire, les cellules neuroépithéliales se différencient en cellule de la glie radiaire. Les cellules de la glie radiaire sont l'élément central de la neurogénèse puisqu'elles jouent le rôle de progéniteurs neuronaux, donnant naissance aux neurones, astrocytes, oligodendrocytes et cellules épendymales (Rakic, 2003). Le processus de neurogénèse est régulé par des vagues calciques spontanées au niveau de la glie radiaire. Les neurones nouvellement formés migreront le long de la glie radiaire dans l'épaisseur du tube neural (Weissman et al., 2004).

La gliogénèse démarre plus tard lors du développement embryonnaire et se poursuit lors des premiers jours après la naissance chez les rongeurs. Les astrocytes dérivent, à la fois des progéniteurs et de la glie radiaire qui génèrera les astrocytes par division asymétrique après la migration neuronale (Verkhratsky and Butt, 2013).

Chez de nombreux vertébrés, la neurogénèse perdure à l'âge adulte mais se trouve restreinte à la zone sous ventriculaire (SVZ) et au niveau du *gyrus denté* de l'hippocampe. Les cellules souches de la SVZ et du *gyrus denté* produisent également des astrocytes (Ming and Song, 2011).

Les astrocytes, et la glie au sens large, remplissent donc très tôt des fonctions primordiales, qui les placent comme des éléments essentiaux du développement du système nerveux central.

1.5.2. Genèse, maintien et élimination des synapses.

Au cours de la vie, les synapses sont en permanence créées, renforcées, affaiblies et éliminées. Lorsque des synapses sont formées, les astrocytes contrôlent leur maturation à travers différents systèmes de signalisation (pour revue voir Eroglu & Barres 2010 et **Tableau** 4). Sur les modèles de cultures neuronales, la présence d'astrocytes augmente la réponse post-synaptique en augmentant le nombre de récepteurs post-synaptiques. A l'inverse, l'absence d'astrocytes diminue le nombre de synapses (Nishida and Okabe, 2007). Dans des modèles

plus intégrés de tranche de cerveau, il a également été décrit des phénomènes de régulation de plasticité synaptique. Par exemple, durant la lactation, les astrocytes du noyau supraoptique de l'hypothalamus ont tendance à se retirer des synapses pour permettre la formation de nouvelles synapses. A la fin de la période de lactation, les astrocytes envahiront de nouveau les synapses afin de participer à l'élimination des synapses qui ne seront plus stimulées (Piet et al., 2002).

Plus récemment, une étude a révélé l'aspect dynamique de la motilité des prolongements périsynaptiques astrocytaires (Bernardinelli et al., 2014a). Cette étude démontre, en mesurant un index de motilité des prolongements astrocytaires, que l'activité synaptique (induite pharmacologiquement, électriquement ou lors de protocoles de LTP) favorise le recouvrement des synapses par les astrocytes sur tranches organotypiques d'hippocampe. *A contrario* son inhibition par la TTX tend à diminuer l'index de motilité des prolongements astrocytaires. Cette motilité des prolongements est dépendante des récepteurs astrocytaires mGluR1 et 5 ainsi que de l'activité calcique astrocytaire. Cette étude démontre également un corrélat physiologique *in vivo* de cette motilité astrocytaire. En effet, l'index de motilité augmente au niveau des synapses du cortex somatosensoriel à la suite de stimulations mécaniques des vibrisses de souris. Cette étude conclue que cette motilité des prolongements astrocytaires, permet une stabilisation des synapses fortement sollicitées, afin de rendre la transmission synaptique plus efficace.

Tableau 4 Facteurs gliaux contrôlant le développement synaptique. Abréviations : TSP thrombospondin, PKC protein kinase C, TGF- β transforming growth factor β , FIG-1 Factor induced gene 1, UNC-6 netrin. D'après (Eroglu and Barres, 2010).

Glia type	Signal type	Signal	Action
Ratastrocyte	Secreted	TSP1, TSP2, TSP3, TSP4 and TSP5	Induce excitatory synapse formation (but synapses are postsynaptically silent, owing to a lack of AMPA receptors) ^{41,42}
		Unknown	Induces excitatory synapse formation (and synapses are postsynaptically active, given the presence of AMPA receptors at the synapse)
		Unknown	Induces inhibitory synapse formation and neurite outgrowth by activating TrkB signalling in neurons ⁴⁹⁵⁰
		Cholesterol and apolipoprotein E	Enhance synaptic function ⁴⁷ by facilitating presynaptic release ⁴¹ and dendritic maturation ⁴⁸
		D-Serine	Controls activity dependence of long-term potentiation and long-term depression68
	Cell surface	Unknown, possibility integrins (PKC-signalling dependent)	Regulates synaptic receptivity of embryonic neurons ⁵⁵ in response to contact-dependent astrocyte signals ⁵⁶
		y-Protocadherins	Facilitate correct execution of excitatory and inhibitory synaptogenesis ⁵⁹
Frog Schwann cell	Secreted	TGF-β	Induces neuromuscular junction formation ⁵¹
		Unidentified low-molecular-mass molecule (not ATP or glutamate)	Enhances synaptic activity at the neuromuscular junction ⁵²
C. elegans glia	Secreted	FIG-1	Regulates sensory organ formation and function ⁶¹
	Cell surface	UNC-6 (also known as netrin)	Instructs axonal growth and presynaptic assembly ⁶⁰

1.5.3. Barrière hémato-encéphalique.

Le SNC est isolé du reste de l'organisme par une série de barrières qui régulent dynamiquement les molécules et solutés pouvant diffuser depuis le sang vers le SNC et *vice versa*. L'une de ces barrières, appelée la barrière hémato-encéphalique (BHE), régule les échanges entre les vaisseaux sanguins intracérébraux et le parenchyme cérébral. Elle est formée par des jonctions serrées entre les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et les pieds périvasculaires astrocytaires qui enveloppent la paroi capillaire. Cette barrière existe dans tout le SNC à l'exception des organes circumventriculaires, de la neurohypophyse, la glande pinéale, les organes subfornicaux et la lame terminale qui sont impliqués dans la neurosécrétion endocrine et ne nécessite donc pas d'être isolé du reste de l'organisme (Verkhratsky and Butt, 2013).

La membrane des pieds périvasculaires astrocytaire peut être considérée comme un compartiment spécialisé puisqu'elle est enrichie en canaux potassiques (K_{ir} 4.1) et en aquaporines (AQP4 principalement) qui sont importants pour l'homéostasie potassique et hydrique au niveau de la BHE. Les activités calciques au niveau des pieds périvasculaires astrocytaires semblent également être indépendantes du reste des activités de l'arborisation et du soma des astrocytes (Shigetomi et al., 2013b).

Il semble que chaque astrocyte participe à la formation de la BHE par l'intermédiaire d'au moins un pied périvasculaire astrocytaire, établissant ainsi l'unité vasculaire neurogliale nécessaire aux échanges métaboliques (Mathiisen et al., 2010). Les astrocytes participent aussi à la régulation du tonus vasculaire afin de lier les besoins métaboliques à la circulation sanguine locale (couplage neurométabollique).

1.5.4. Support énergétique et métabolique.

Bien que représentant seulement 2 % du poids du corps humain, le cerveau consomme environ 20 % du glucose et de l'oxygène, qu'il puise dans la circulation sanguine. Le glucose traverse la BHE par le biais de transporteurs du glucose (GLUT) exprimés par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Une fois dans l'espace extracellulaire, il est recapté par les neurones et les astrocytes, exprimant tous deux les transporteurs GLUT. Les neurones consomment 90 % de l'énergie mais la recapture du glucose est équivalente dans les deux types cellulaires. Les astrocytes servent ensuite de « support métabolique » aux neurones *via* le cycle du lactate. Après recapture, le glucose est transformé en pyruvate puis en lactate, grâce à la glycolyse. Le lactate est alors transféré au niveau neuronal, où il entrera dans le cycle tricarboxylique afin de fournir de l'ATP, principal substrat énergétique impliqué dans

les fonctions neuronales (**Figure 10**) (Pellerin, 2010; Tsacopoulos and Magistretti, 1996). Lors d'activités neuronales les besoins énergétiques augmentent, induisant une augmentation du débit sanguin cérébral. Ce phénomène de couplage entre l'activité neuronale et le flux sanguin est qualifié d'hyperhémie fonctionnelle et est contrôlé par les astrocytes par l'intermédiaire des pieds périvasculaires astrocytaires.



Figure 10 Couplage énergétique entre astrocytes et neurones. Représentation schématique de la recapture du glucose et de la glycolyse dans les astrocytes et les neurones. Le glucose est transporté dans le milieu intracellulaire grâce aux transporteurs GLUT3 dans les neurones et GLUT1 dans les astrocytes. Le glucose entre alors dans le cycle de la glycolyse. Au niveau de l'astrocyte, la glycolyse permet de libérer du lactate dans le milieu extracellulaire (via l'action des transporteurs MCT1 et 4). Le lactate est recapté par le neurone via l'action des transporteurs MCT2. Celui-ci est transformé en pyruvate via l'action de la LDH1 et sert alors de substrat énergétique au neurone. MCT : monocarboxylate transporter, LDH : lactate dehydrogenase. D'après Pellerin 2010.

1.5.5. Homéostasie ionique et régulation de l'osmolarité.

Outre la régulation du métabolisme énergétique, les astrocytes sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie ionique, grâce à l'expression de différents transporteurs et canaux ioniques (pour revue voir Simard & Nedergaard 2004). Le contrôle de la concentration ionique extracellulaire est primordial car toute modification affecte les propriétés membranaires et donc l'excitabilité des cellules. Le potassium est particulièrement concerné car sa concentration extracellulaire peut doubler localement lors d'une transmission synaptique. Les astrocytes sont capables de réguler cette concentration selon deux mécanismes. Le premier est qualifié de « *transient storage* » et consiste en un stockage transitoire en attendant la diminution de la concentration potassique extracellulaire. Lorsque ce mécanisme est saturé, le « *spatial buffering* » intervient. Il consiste en la recapture du potassium puis en sa diffusion dans tout le réseau astrocytaire, *via* les pompes Na⁺/K⁺ ou *via* une diffusion passive par des canaux ioniques (Walz, 2000).

Lors d'une transmission de potentiel d'action, la recapture du potassium extracellulaire s'accompagne d'une augmentation du volume hydrique astrocytaire. Par ailleurs, la recapture de l'eau au niveau de la synapse permettrait de diminuer le volume de la fente synaptique, concentrant ainsi les neurotransmetteurs libérés (pour revue voir Amiry-Moghaddam & Ottersen 2003; Simard & Nedergaard 2004). Une fois recaptée, l'eau est redistribuée dans tout le réseau astrocytaire.

Enfin, les astrocytes libèrent et expriment des récepteurs aux neuropeptides (comme l'atriopeptine, l'angiotensinogène ou la vasopressine), impliqués le contrôle de l'homéostasie de l'eau (pour revue voir Simard & Nedergaard 2004; Benfenati & Ferroni 2010).

1.5.6. Gliotransmission.

L'une des découvertes les plus récentes concernant les astrocytes est leur aptitude à libérer des gliotransmetteurs, capables de moduler l'excitabilité neuronale ou la transmission synaptique. Le premier gliotransmetteur mis en évidence a été le glutamate (Parpura et al., 1994), puis d'autres comme l'ATP (Wang et al., 2000b) et la D-sérine (Mothet et al., 2000) ont suivi. Il a été plus récemment montré que les astrocytes sont également capables de libérer du GABA ou des neuropeptides (Angulo et al., 2008; Héja et al., 2009; Lee et al., 2010b).

Dans le domaine de la gliotransmission, deux mécanismes de libération semblent coexister. En effet, certaines études font état d'une exocytose dépendante du Ca²⁺, alors que d'autres mettent en avant des mécanismes non vésiculaires. La libération vésiculaire (ou exocytose) est la principale voie de libération des neurotransmetteurs par les neurones. Cette voie est dépendante du calcium et fait intervenir toute une machinerie protéique particulière. En effet, elle requiert l'intervention de molécules responsables du remplissage des vésicules, de son arrimage avec la membrane plasmique puis de la fusion des deux membranes. Au niveau de la membrane vésiculaire, ce sont les protéines synaptotagmine I et synaptobrevine (ou VAMP2 pour vesicule-associated protein 2). Sur la membrane plasmique, on trouve la syntaxine et SNAP 25 (synaptosome associated protein). Ces protéines interagissent pour former le complexe SNARE (soluble Nethylmaleimide-sensitive factor associated protein receptor) qui permettrait d'ancrer les vésicules synaptiques à la membrane pour les mener à la fusion (Sutton et al., 1998). Il est aujourd'hui admis que les astrocytes expriment certaines protéines impliquées dans l'exocytose, comme les protéines du complexe SNARE ou encore la synaptotagmine I (Bezzi et al., 2004; Hamilton and Attwell, 2010; Volterra and Meldolesi, 2005).

L'hypothèse de l'exocytose fut renforcée par des études qui ont montré que les astrocytes expriment la protéine VGLUT (*vesicular glutamate transporter*) ou VNUT (*vesicular nucleotide transporter*), permettant de remplir les vésicules en glutamate et en ATP respectivement (Bezzi et al., 2004; Hamilton and Attwell, 2010; Volterra and Meldolesi, 2005). De plus, des études de microscopie électronique ont montré que les astrocytes disposent de vésicules de 30 à 1000 nm de diamètre à corps clairs et denses (Parpura et al.,

2010). Il a également été montré que les corps clairs de 30 nm sont localisés près des terminaisons synaptiques (Jourdain et al., 2007).

La D-sérine serait libérée au niveau astrocytaire, principalement par les mécanismes d'exocytose vésiculaire dépendante du calcium. Des études utilisant la thapsigargine pour dépléter les stocks de calcium interne ou en utilisant des chélateurs calciques (Mothet et al., 2005), des souris déficientes pour l'IP₃R2 (Takata et al., 2011) ou l'inhibition du canal TRPA1 (Shigetomi et al. 2013) afin d'empêcher les élévations du Ca²⁺ astrocytaire, induisent une diminution des libérations de D-sérine.

A l'inverse, certaines études ont montré que le calcium n'était pas impliqué dans la gliotransmission (Agulhon et al., 2010; Fiacco et al., 2007). En effet, l'induction d'un signal calcique dans un astrocyte ne provoque pas de gliotransmission. Cette induction a été réalisée de manière spécifique dans les astrocytes grâce à l'utilisation de souris transgéniques, exprimant un récepteur métabotropique (MrgA1) sous le promoteur de la GFAP. Toutefois, l'utilisation des souris transgéniques MrgA1 est soumise à controverse (Volterra et al., 2014) car le signal calcique induit est important et persiste plusieurs minutes à la fois au niveau somatique et dans toute l'arborisation astrocytaire. Cette stimulation calcique importante ne ressemble à aucun mécanisme physiologique. Les auteurs proposent néanmoins que la gliotransmission pourrait alors résulter de mécanismes non vésiculaires (Fiacco et al., 2007).

Les mécanismes de libération non vésiculaires sont de différents types (**Figure 11**) et font appel à : **1**) l'implication des transporteurs qui fonctionneraient de façon inversée (Anderson and Swanson, 2000; Hamilton and Attwell, 2010), **2**) la libération *via* les hémicanaux (Orellana et al., 2011b; Yi et al., 2016), **3**) la diffusion *via* les récepteurs ionotropiques de l'ATP, de type P2X7 (Halassa et al., 2007; Hamilton and Attwell, 2010), **4**) la libération d'acides aminés comme le glutamate ou la taurine *via* les canaux anioniques activés par des modification du volume (Hamilton and Attwell, 2010), **5**) certains canaux comme Best-1 (Jo et al., 2014; Woo et al., 2012).

La gliotransmission est un mécanisme astrocytaire de modulation de l'activité synaptique reconnu. Cependant, les conditions favorisant un mode de libération, vésiculaire ou non vésiculaire, restent à déterminer.



Figure 11 Mécanismes impliqués dans la gliotransmission. La gliotransmission peut avoir lieu par l'intermédiaire de transporteurs, récepteurs et hémicanaux. Ainsi que par le mécanisme de libération vésiculaire (exocytose). D'après (Verkhratsky and Butt, 2013).

1.5.7. Astrocytes et espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Les astrocytes représentent une défense majeure contre les espèces réactive de l'oxygène (ROS). Premièrement, ils expriment spécifiquement des enzymes de protection contre le stress oxydant comme la superoxyde dismutase 1 (SOD1), qui n'est pas exprimée par les neurones, et des molécules anti-oxydantes telles que le glutathion. Les astrocytes produisent le glutathion à partir de la cystine, qu'ils accumulent grâce à l'échangeur cystine-glutamate. La cystine sera ensuite réduite en cystéine puis convertie en γ -glutamylcystéine et glutathion. Les neurones utilisent le glutathion astrocytaire car ils ne sont pas en mesure de le synthétiser (Wang and Cynader, 2002).

Les astrocytes interviennent également dans la mise en jeu d'un antioxydant puissant, l'acide ascorbique (vitamine C). Lorsqu'il réagit avec les ROS, l'acide ascorbique se transforme en acide déhydroascorbique neurotoxique. Grâce à un co-transport électrogénique couplé au sodium, les astrocytes peuvent accumuler de fortes concentrations d'acide déhydroascorbique et le convertir en ascorbate. L'ascorbate sera alors libéré dans le milieu extracellulaire afin de participer à nouveau à la prise en charge des ROS (García-Krauss et al., 2015).

1.6. Synapse tripartite.

Ce concept, fut proposé en 1999 par Alfonso Araque, Vladimir Parpura, Rita P. Sanzgiri et Philip G. Haydon (Araque et al., 1999) en complément des travaux de Rachel Ventura et Kristen Harris (Ventura and Harris, 1999). Ces derniers, basés sur l'utilisation de techniques de microscopie électronique, avaient permis la mise en évidence d'une juxtaposition des membranes astrocytaires avec des éléments synaptiques au sein de l'hippocampe. Cette

proximité physique s'est avérée être fonctionnelle car il avait été observé, d'une part, que les élévations de concentration de calcium astrocytaire pouvaient résulter d'activités neuronales, et d'autre part, que les augmentations de concentration intracellulaire de calcium étaient liées à la libération de glutamate par les astrocytes. En effet, en 1996, le groupe de Ken McCarthy a mis en évidence que lors d'une stimulation des collatérales de Schaffer soutenue, les neurotransmetteurs libérés peuvent s'échapper de la fente synaptique et activer en retour les astrocytes environnants (Porter and McCarthy, 1996). Cette activation astrocytaire se traduit par des augmentations de Ca²⁺ intracellulaire dépendantes des récepteurs au glutamate métabotropiques exprimés par les astrocytes.

Puis, en 1998, Alfonso Araque a mis en évidence sur cultures cellulaires que les élévations de Ca^{2+} induites par stimulation mécanique ou électrique des astrocytes étaient responsables de libérations de glutamate, capables d'activer les récepteurs NMDA neuronaux (A. Araque et al. 1998; A Araque et al. 1998b).

Il a ainsi été démontré que les astrocytes sont capables, en plus d'être présent physiquement au niveau synaptique, d'écouter et de réagir à l'activité synaptique, mais également de lui répondre en la modulant directement. Ce sont sur ces critères que le concept de la synapse tripartite fut proposé (**Figure 12 ; Figure 13**).



Figure 12 L'astrocyte comme troisième élément de la synapse tripartite. (**A**) Coupe de microscopie électronique montrant les éléments pré synaptique (Pre) et post synaptique (Post) enrobés par un prolongement astrocytaire (en vert) formant ainsi la synapse tripartite. (**B**) L'apposition du prolongement astrocytaire aux éléments synaptiques neuronaux permet de remplir différents rôles, tels que la recapture du K⁺ et du glutamate dont la concentration augmente à la suite d'activité neuronale. Les libérations de neurotransmetteurs par le neurone pré synaptique peuvent activer les récepteurs métabotropiques astrocytaires, ce qui entraînera des libérations de Ca²⁺ dépendantes de l'IP₃ depuis les stocks internes, capable de libérer des gliotransmetteurs. D'après (Halassa et al., 2007).

Au niveau de l'hippocampe de rat adulte, il a été mis en évidence que $62,2 \pm 2,6$ % des synapses sont enrobées par un prolongement astrocytaire en condition physiologique après fixation (Ventura and Harris, 1999; Witcher et al., 2007). Ces deux études mettent également en évidence que les synapses tendent à être plus larges (et supposément plus actives) lorsqu'elles sont enrobées. Cette hypothèse fut confirmée en 2014, puisqu'une étude (décrite précédemment) a démontré que l'activité synaptique favorise l'enrobage des synapses par les astrocytes (Bernardinelli et al., 2014a)

Finalement, s'il fut annoncé dès la fin des années 90, le concept de la synapse tripartite n'a cessé de se renforcer au fil des études portant sur les astrocytes et les interactions neuroneglie. Initialement attribué à la capacité des astrocytes à venir contacter physiquement les synapses et à recapter/libérer des neuro/gliotransmetteurs, ce concept englobe actuellement l'ensemble des caractéristiques et fonctions astrocytaires présentées dans cette introduction. Il est ainsi clairement établi que les astrocytes participent activement à la transmission synaptique en régulant l'homéostasie de la synapse au sens large mais également en régulant la morphologie de cette dernière. De plus en plus d'études suggèrent logiquement que son implication ne soit pas limitée à la physiologie de la synapse mais intervienne également lors des dysfonctions synaptiques liées à différentes pathologies. Ainsi, la seconde partie de cette introduction et les résultats présentés dans ce manuscrit tenteront de démontrer que l'astrocyte peut être au cœur des dysfonctions synaptiques associées à la maladie d'Alzheimer.



Figure 13 Reconstruction 3D de synapses enrobées par les astrocytes. (**A**) Reconstruction en 3 dimensions de synapses d'hippocampe de rats adultes obtenue par coupes sériées en microscopie électronique. L'astrocyte est représenté en vert, s'insinuant au travers de dendrites neuronales en jaune, rouge et violet. (**B**) Grossissement de l'enrobage d'une épine dendritique de type *mushroom* par un astrocyte. (**C**) Certaines épines ne sont enrobées qu'au niveau de leur cou. D'après (Witcher et al 2007).

2. Maladie d'Alzheimer et astrocytes

2.1. La maladie d'Alzheimer.

2.1.1. Généralités.

La maladie d'Alzheimer fut décrite en 1906 par Alois Alzheimer, psychiatre et neuropathologiste allemand, après la mort d'une patiente (Auguste Deter) atteinte de démence. Suite à l'analyse histologique de son cerveau, A. Alzheimer a pu identifier des lésions caractéristiques, les enchevêtrements neurofibrillaires et les plaques séniles (Graeber et al., 1997). En 1911, suite à la découverte d'un second cas, le psychiatre Emil Kraeplin proposa le terme de maladie d'Alzheimer pour ce type de démence.

La prévalence globale des démences (dont la maladie d'Alzheimer est à l'origine dans 70 % des cas), qui se caractérisent par une détérioration progressive des fonctions cognitives et du comportement, est de 24 millions de personnes affectés en 2005 et pourraient, selon les simulations, quadrupler d'ici 2050 (Ferri et al., 2005). La maladie d'Alzheimer représente par conséquent un problème de santé à l'échelle mondiale. Ainsi, le coût de la prise en charge des patients, s'élève à 172 milliards de dollars par an aux États-Unis (Reitz and Mayeux, 2014). Le nombre de nouveaux cas parmi la population globale est de 1 % chez les personnes âgées de 65 à 70 ans et de 6 à 8 % pour les plus de 85 ans (Mayeux, 2003). Les démences et la maladie d'Alzheimer représentent donc un enjeu économique, social et médical majeur.

2.1.2. Epidémiologie.

2.1.2.1. Facteurs génétiques

Trois gènes, APP PSEN1 et PSEN2 (codant respectivement pour les protéines *amyloid precursor protein* APP, *presenilin* 1 PS1 et *presenilin* 2 PS2), sont impliqués dans la production du peptide amyloïde beta (A β) et sont fortement corrélés à la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. Certaines mutations sur ces 3 gènes, induisent chez l'homme une surproduction du peptide A β , responsables des formes agressives dites familiales et représentent environ 5 % des cas de la pathologie (LaFerla et al., 2007; Selkoe, 2011).

Pendant plus d'une décennie, un seul facteur de risque génétique, l'allèle APOE E4, était connu comme créant une « susceptibilité » de développer la maladie avec l'âge (Kuusisto et al., 1994). APOE (apolipoprotéine E) possède 3 isoformes chez l'homme, portées par 3 allèles E2, E3 et E4. Être porteur d'une copie de l'allèle E4 est associé à une augmentation du risque de développer la maladie par 2. Avoir 2 copies est associé à une multiplication du risque par 5 et plus (Kuusisto et al., 1994). De plus, la présence d'APOE E4 abaisse l'âge de survenue de la pathologie de 6 ou 7 ans.

Plus récemment, des études d'associations pangénomiques (GWAS) ont révélé de nombreux autres facteurs de susceptibilité génétique (**Tableau 5**). Les formes familiales, ainsi que les facteurs de susceptibilité génétique, partagent la conséquence commune d'augmenter la production d'amyloïde β et, par extension, la neurotoxicité.

Ethnic group	Sample size	Genes identified outside APOE region
Caucasian	Stage 1: 2032 AD cases: 5328 controls	CLU, CR1
	Stage 2: 3978 AD cases; 3297 controls	
Caucasian	Stage 1: 3941 AD cases; 7848 controls	CLU, PICALM
	Stage 2: 2023 AD cases; 2340 controls	
Caucasian	Stage 1: 3006 AD cases; 4642 controls	BIN1, XOC3L2/BLOC1S3/MARK4, CLU, PICALM
	Stage 2: 2032 AD cases; 5328 controls	
	Stage 3: 3333 AD cases; 6995 controls	
Caucasian	Stage 1: 8309 AD cases; 7366 controls	MS4A4A, CD2AP, CD33 and EPHA1, CR1, CLU, BIN1, PICALM
	Stage 2: 3531 AD cases; 3565 controls	
Caucasian	Stage 1: 6688 AD cases; 13,685 controls	ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33, CD2AP
	Stage 2: 4896 AD cases; 4903 controls	
	Stage 3: 8286 AD cases; 21,258 controls	
Caucasian	Stage 1: 17,008 AD cases; 37,646 controls	CR1, CD33, BIN1, CD2AP, CLU, EPHA1, PICALM, MS4, ABCA7HLA-DRB5/HLA-DRB1,
	Stage 2: 8572 AD cases; 11,312 controls	PTK2B, SORL1, SLC24A4/RIN3, DSG2
Caribbean Hispanic	549 AD cases; 544 controls	CLU, PICALM, BIN1, CUGBP2, loci on 2p25.1; 3q25.2; 7p21.1; 10q23.1
African American	1968 AD cases; 3928 controls	ABCA7, intergenic locus on 5035,2

 Tableau 5 Facteurs génétiques identifiés par études d'association pangénomiques.
 Adapté d'après (Reitz and Mayeux, 2014).

2.1.2.2. Facteurs de risque et facteurs protecteurs.

Au-delà des facteurs génétiques, certaines pathologies ainsi que des facteurs environnementaux et des habitudes de vie, ont été identifiés comme pouvant augmenter ou diminuer le risque de développer des démences liées à la maladie d'Alzheimer (pour revue voir Mayeux 2006; Reitz & Mayeux 2014). Ainsi, les dommages occasionnés au niveau de l'encéphale par les maladies cérébrovasculaires et les troubles de la pression artérielle peuvent augmenter ce risque. L'obésité, le diabète de type 2 et les troubles métaboliques participeraient également à augmenter ce risque. Le fait de fumer de façon régulière participerait également à favoriser le développement de la pathologie, indirectement, en augmentant le risque de troubles cérébrovasculaires.

De manière opposée, le fait de fumer pourrait également selon certaines études, participer à augmenter le nombre de récepteur à l'acétylcholine et donc contrebalancer la diminution de

ces récepteurs, observée lors de la maladie d'Alzheimer (Connelly and Prentice, 2005). Ainsi, d'autres facteurs protecteurs ont été identifiés. Ces facteurs sont de caractères sociaux et environnementaux pour la plupart. L'alimentation de type méditerranéenne par exemple (associée à une consommation de légumes, poissons, peu de viande rouge et une consommation de vin modérée), semble réduire l'incidence de la maladie d'Alzheimer (Scarmeas et al. 2009; Gu et al. 2010). L'activité physique, en augmentant la circulation sanguine et l'oxygénation du cerveau semble protectrice selon certains auteurs (Scarmeas et al., 2009). Enfin, les stimulations cognitives et intellectuelles semblent également participer à la prévention du risque de développer la maladie d'Alzheimer, on parle alors d'une réserve cognitive protectrice (Carlson et al., 2008; Fratiglioni et al., 2004).

Hormis pour les formes familiales, l'étiologie de la maladie d'Alzheimer est mal connue et semble résulter de l'interaction entre plusieurs facteurs. Cependant, ces différentes causes convergent toutes vers une physiopathologie commune, décrite dans le paragraphe suivant.

2.1.3. Physiopathologie générale de la maladie.

Chez l'homme, la maladie d'Alzheimer se caractérise dans les stades avancés par une atrophie cérébrale, des sillons plus marqués et un élargissement des ventricules (**Figure 14**). Au niveau tissulaire, deux lésions histologiques caractérisent la maladie d'Alzheimer. D'une part, les plaques séniles qui sont composées d'agrégats du peptide A β . Ces agrégats extracellulaires insolubles sont composés de fibrilles du peptide A β organisées en feuillets β antiparallèles. D'autre part, on observe des enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires (également nommés dégénérescences neurofibrillaires DNF), qui sont composés d'agrégats de la protéine Tau hyperphosphorylée.



Figure 14 Lésions macroscopiques et histologiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. (A) Cerveau de patient atteint de la maladie d'Alzheimer présentant des sillons excessivement creusés. (B) Coupes frontales d'hémisphères de patient sain (control) et malade (AD). Le cerveau de droite présente une atrophie généralisée, un amincissement du cortex (pointe de flèche) et une atrophie de l'hippocampe (flèche). Echelle 1 cm. (C) Au niveau microscopique, la maladie est caractérisée par la présence de plaques amyloïdes (flèche) et
Maladie d'Alzheimer et astrocytes

d'enchevêtrements neurofibrillaires (pointe de flèche).Ces deux lésions tissulaires sont identifiées par marquage à la thioflavine S. Echelle 20 µm. (A) d'après http://library.med.utah.edu/ (B et C) d'après (Crimins et al., 2013).

Ces deux lésions tissulaires suivent une évolution temporelle différente (Braak and Braak, 1991). Un modèle en plusieurs étapes, issu de cette évolution a été proposé (**Figure 15**). Les DNF sont généralement retrouvées en premier lieu au niveau du cortex entorhinal et de l'hippocampe. Ces premières étapes sont dites silencieuses, car elles peuvent être asymptomatiques ou associées à de légers troubles (dans le cas de *mild cognitive impairments* MCI). Lors de l'évolution de la maladie, les DNF atteindront les zones limbiques puis corticales. Ces derniers stades s'accompagnent de troubles cognitifs importants.

La surproduction du peptide amyloïde précède l'apparition des DNF. On les retrouve initialement au niveau cortical puis dans les aires corticales associatives et dans l'hippocampe. A terme l'ensemble du cortex sera envahi par les plaques amyloïdes.



Figure 15 Distribution spatiale et temporelle des enchevêtrements neurofibrillaires et dépôts amyloïdes. Le panneau de gauche décrit la distribution des DNF selon les différents stades de Braak. Le panneau de droite décrit l'évolution des plaques amyloïdes. D'après (Braak and Braak, 1991).

2.1.4. Le peptide amyloïde beta (Aβ).

Le peptide A β est un polypeptide d'environ 4 kDa, issu du clivage de la protéine APP située sur les membranes plasmiques, lysosomales, endosomales, mitochondriales ainsi que sur l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (LaFerla et al., 2007). Le clivage de la protéine APP est réalisé par un groupe d'enzymes nommées α - β - et γ -sécrétase (**Figure 16**). Trois enzymes avec une activité α -sécrétase ont été identifié, ADAM9, 10 et 17 (pour *a disintegrin and metalloproteinase family enzyme*). La β -sécrétase est portée par l'enzyme β *site APP-cliving enzyme* 1 (BACE1). La γ -sécrétase, quant à elle, regroupe un complexe enzymatique composé des présénilines 1 et 2 (PS1 & 2), nicastrines, *l'anterior pharynx defective* (APH-1) et la *presenilin enhancer* 2 PEN2 (Francis et al., 2002; Levitan et al., 2001; Steiner et al., 2002; Wolfe et al., 1999; Yu et al., 2000). Le clivage d'APP existe selon deux voies, l'une dite non amyloïdogénique, l'autre, amyloïdogénique conduisant à la formation du peptide $A\beta_{1-42}$ responsable des effets toxiques de la maladie d'Alzheimer.

Au sein de la voie non amyloïdogénique, APP est clivé par l' α -sécrétase dans la région Cterminale de la protéine, produisant un fragment de 83 acides aminés (C83) et la forme sAPP α qui sera secrétée dans le milieu extracellulaire. Le fragment C83 sera ensuite clivé par la γ sécrétase produisant un fragment nommé p3 (Haass et al., 1993).

La voie amyloïdogénique est médiée par la β -sécrétase en position C-terminale au niveau de l'acide aminé 99. Ce premier clivage produit le fragment sAPP β sécrété dans le milieu extracellulaire. Puis la γ -sécrétase clivera le fragment C99, libérant le fragment A β . Cette séquence de clivage conduira dans 90 % des cas à la formation d'A β_{1-40} peu toxique et, dans 10 % des cas, aboutira à la formation d'A β_{1-42} , qui est la forme toxique. L'A β_{1-42} constitue l'isoforme prédominante au sein des plaques amyloïdes (Younkin, 1998).



Figure 16 Protéolyse d'APP. Le peptide amyloïde beta est dérivé du clivage de la protéine APP. APP peut subir deux voies protéolytiques différentes, non amyloïdogénique (à gauche) et amyloïdogénique (à droite). Le clivage par l' α -sécrétase est réalisé par les enzymes de la famille ADAM. Ce clivage est réalisé à l'intérieur du domaine amyloïde, empêchant donc la production d'A β . Deux fragments sont générés, sAPP α et C83. Pour la voie amyloïdogénique la β -sécrétase (enzyme BACE1) produit deux fragments sAPP β et C99. Le fragment C99 sera ensuite clivé par le complexe enzymatique de la γ -sécrétase pour libérer le peptide A β . D'après (LaFerla et al., 2007).

2.1.5. L'hypothèse calcique.

Une des hypothèses pouvant expliquer les changements observés lors du vieillissement normal et pathologique (dans le cas de la maladie d'Alzheimer) du SNC, est l'hypothèse calcique (**Figure 17**). Cette hypothèse, postule que l'accumulation progressive de dérégulations « silencieuses » de l'homéostasie calcique puisse affecter l'homéostasie et la signalisation cellulaire, la transmission synaptique et la survie cellulaire. Lors de maladies neurodégénératives, ces altérations seraient alors accélérées, conduisant à une mort cellulaire excessive, une atrophie cérébrale et la démence telle qu'elle est observée dans la maladie d'Alzheimer (Toescu et al., 2004; Verkhratsky and Toescu, 1998; Verkhratsky et al., 2016a).

Cette hypothèse, très neurocentrique, fut renforcée par différentes évidences de dérégulations de l'homéostasie calcique neuronale. Au début des années 1990, des augmentations massives de Ca²⁺ intra neuronales furent observées sur des cultures de neurones fœtaux corticaux humains exposés à des concentrations d' A $\beta_{1-38/25-35}$ comprises entre 1 et 80 μ M pendant 4 jours (Mattson et al., 1992). Ces expositions massives et prolongées étaient également liées à une mort neuronale importante. L'hypothèse de l'époque, qui a persisté pendant près de deux décennies, consistait en la capacité ionophorétique d'Aß à former de larges pores membranaires perméables au Ca²⁺. Ces entrées de Ca²⁺ seraient alors amplifiées par des relâchements de calcium via le réticulum endoplasmique. Malgré des conséquences que l'on imagine désastreuses pour la survie cellulaire (par déstabilisation de l'homéostasie ionique et osmotique par exemple), cette hypothèse peu parcimonieuse a persisté. Plus récemment, l'hypothèse calcique a évolué en une modulation des acteurs de la signalisation calcique au sens large. Il a été montré que le peptide $A\beta_{1-42}$ peut interagir directement avec les récepteurs α7nAChR (Wang et al., 2000a). La toxicité du peptide Aβ₁₋₄₂ pourrait également être dépendante des récepteurs NMDA extra synaptiques, par action directe sur ces récepteurs ou par défaut de recapture du glutamate par les astrocytes (Rush and Buisson, 2014). Le canal calcique CALHM1 (Ca²⁺ homeostasis modulator 1), présente un polymorphisme génétique chez des patients présentant des formes précoces de la maladie d'Alzheimer (Rubio-Moscardo et al., 2013), ces modifications impliquant directement une dérégulation de l'homéostasie calcique. Enfin, il est généralement admis que les mutations des présénilines induisent des libérations excessives de Ca²⁺ en provenance du réticulum endoplasmique dépendantes des récepteurs à l'IP₃ et à la ryanodine (LaFerla, 2002; Smith et al., 2005).

La plupart de ces modifications de l'homéostasie calcique ont été étudiées, jusque très récemment, uniquement au niveau neuronal. Or, si on les met ces modifications en

perspective avec l'importance de la signalisation calcique astrocytaire, il devient très probable que certaines de ces modifications soient retrouvées au niveau astrocytaire, plaçant alors ces cellules comme des acteurs privilégiés de la maladie d'Alzheimer.



Figure 17 L'hypothèse calcique liée à la maladie d'Alzheimer. Le peptide $A\beta$ module l'activité calcique, synaptique et les mécanismes d'apoptose selon plusieurs voies. (1) $A\beta$ induit des entrées de Ca²⁺ en modulant le canal CALHM1. A β peut également interagir avec la protéine du prion et induire des entrées de Ca²⁺ renforcée par un mécanisme dépendant du réticulum endoplasmique. (2) La libération intracellulaire du produit de clivage AICD de l'APP peut altérer le système de tamponnage du Ca²⁺ par le récepteur à la ryanodine et la calbindine. (3) Les mutations des présénilines peuvent activer la pompe SERCA et le récepteur à l'IP₃. (4) La somme de ces modifications altère la plasticité synaptique et stimule la libération de cytochrome C déclenchant les mécanismes apoptotiques. D'après (Berridge, 2010).

2.1.6. Synaptotoxicité d'Aβ.

Aβ est initialement produit sous forme monomérique soluble, puis s'agrège rapidement pour former des complexes multimériques. Ces complexes regroupent les espèces solubles de faibles poids moléculaires (10 à 15 kDa), comme les dimères et trimères, ainsi que les espèces de haut poids moléculaires, les protofibrilles et fibrilles (**Figure 18**). Les espèces oligomériques d'A β_{1-42} (nommées A β_0 dans ce manuscrit) se sont révélées être les plus toxiques (Haass and Selkoe, 2007). Les dimères et trimères sont capables de perturber l'apprentissage, la mémorisation, les fonctions synaptiques et la LTP (Cleary et al., 2005; Walsh et al., 2002) et certaines espèces comme les dodécamères peuvent perturber la cognition et la mémorisation chez des modèles de souris transgéniques (Lesné et al., 2006).



Figure 18 Représentation schématique de la fibrillogénèse d'Aβ. Le peptide Aβ est initialement produit sous forme monomérique, puis s'agrège rapidement en oligomères de faibles poids moléculaires, pour finalement former des protofibrilles et fibrilles qui constitueront les plaques séniles lors de la maladie d'Alzheimer.

Le peptide $A\beta_{1-42}$ est plus hydrophobe que ses analogues plus courts. Ceci lui confère une très forte capacité d'agrégation, qui s'avère être environ 70 fois plus rapide que pour la forme $A\beta_{1-40}$. Au niveau de l'extrémité C-terminale du peptide $A\beta_{1-42}$, deux résidus diffèrent par rapport à $A\beta_{1-40}$, ce qui lui confère des propriétés d'agrégation et de toxicité plus importante (Sgourakis et al., 2007). La capacité d' $A\beta$ à s'agréger dépend également du pH, de la température et des interactions hydrophobes entre peptides. Ainsi, le peptide pourra passer de l'état de monomères organisés en hélice α vers une structure en feuillets β pour les fibrilles (Ahmed et al., 2010). Dans cette dernière étude, l'utilisation de spectroscopie basée sur la résonance magnétique nucléaire, a permis de mettre en évidence que les formes oligomériques ne s'organisent pas en feuillets β , mais est plutôt composés de brins agrégés, adoptant une conformation dite en épingle. Cette conformation particulière serait responsable de la toxicité du peptide.

Cette toxicité induit principalement des pertes et dysfonctions synaptiques. Des quantifications en microscopie électronique et immunohistochimiques ont rapporté des diminution significatives de la densité synaptique des aires corticales associatives et au niveau de l'hippocampe chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Davies et al., 1987; Masliah et al., 2001). De récentes données suggèrent que les formes non fibrillaires d'A β , *via* leurs interactions avec différents récepteurs, participent à la toxicité d'A β (**Figure 19**). Il

existe également une forte corrélation entre la quantité d'A β présente dans le cerveau des patients et l'étendue de la perte synaptique (Wang et al., 1999). Enfin, la surproduction d'A β induit principalement des perturbations de l'activité synaptique, qui à terme peuvent conduire à la perte de ces synapses (**Figure 19**). Ainsi les mutations d'APP induisent des déficits de maintien de la LTP ainsi que des diminutions de la transmission synaptique basale chez des souris transgéniques (APP_{swe}/PS1_{dE9}) âgées de 5 à 18 mois (Fitzjohn et al., 2001; Larson et al., 1999; Moechars et al., 1999).



Figure 19 Récepteurs d'Aβ et cascade d'évènements induits par la toxicité d'Aβ. (Panneau de gauche) Récepteurs membranaires impliqués dans la toxicité d'Aβ. D'après (De Strooper and Karran, 2016). (Panneau de droite) Séquence d'évènements proposés pour expliquer la neurotoxicité d'Aβ. D'après (Selkoe, 2002).

De la même manière que son implication en condition physiologique, ce n'est que récemment que l'implication astrocytaire dans les maladies neurodégénératives en général, et dans le contexte de la maladie d'Alzheimer en particulier, fut investiguée. Cependant, différentes études commencent à accumuler des hypothèses qui semblent placer les astrocytes comme des cibles privilégiées de la toxicité liée à $A\beta$. Ceci n'est pas étonnant, si l'on considère la maladie d'Alzheimer comme une pathologie de la synapse, et par extension de la synapse tripartite.

2.1.7. La phase cellulaire de la maladie d'Alzheimer.

Ce nouveau concept s'oppose au point de vue neurocentrique, visant à expliquer les dysfonctions induites par A β qu'au travers du prisme neuronal. Ce raisonnement tend à introduire une vue holistique, prenant en compte tous les partenaires de la transmission

Maladie d'Alzheimer et astrocytes

synaptique, afin de mieux comprendre les mécanismes induits durant les phases asymptomatiques de la maladie d'Alzheimer. Ce concept repose sur la distinction entre 3 différentes phases (**Figure 20**), l'une biochimique (reprenant les anomalies de Tau et A β), puis cellulaire (basée sur les interactions neurones-glie) et enfin clinique avec l'apparition des symptômes (De Strooper and Karran, 2016).

La phase cellulaire, telle qu'elle est décrite, démarre avec la surproduction d'Aß d'une part et les défauts d'élimination des protéines A_{β1-42} et Tau (sous sa forme anormalement phosphorylée) d'autre part. Du point de vue neuronal, elle regroupe les premiers éléments affectant la transmission, la plasticité et la connectivité synaptique. Enfin, cette phase cellulaire, se concentre essentiellement sur les dysfonctions précoces des interactions neurones-glie. Parmi ces dysfonctions précoces, on retrouve au niveau astrocytaire une phase d'atrophie, qui précède l'hypertrophie associée à l'astrogliose (Kulijewicz-Nawrot et al., 2012). Lors de la phase cellulaire, la microglie est également mise en jeu. En effet, ces cellules réalisent la majeure partie de la phagocytose au niveau du SNC, et représentent environ 10 % des cellules du SNC chez la souris adulte (Lawson et al., 1990). Différents groupes ont mis en évidence une mutation rare d'un récepteur microglial TREM2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2), qui induirait des défauts de phagocytose d'Aß, responsable d'une forte augmentation du risque de développer la maladie d'Alzheimer avec l'âge (Guerreiro et al., 2013; Jonsson et al., 2013). Les oligodendrocytes semblent également impliqués lors de la phase cellulaire de la maladie d'Alzheimer. Ces cellules myélinisent les neurones du SNC et participent donc à la conduction rapide des potentiels d'action. Elles apportent également un support trophique pour les neurones. Les défauts de myélinisation participeraient donc à l'évolution de la maladie, de la phase cellulaire vers la phase clinique (Ettle et al., 2016).



Figure 20 Phases biochimique, cellulaire et clinique de la maladie d'Alzheimer. La phase cellulaire évolue durant une vingtaine d'années chez l'homme. Certaines des modifications observées durant cette phase sont réversibles, telles que les modifications précoces de l'activité synaptique. Durant les phases biochimique et cellulaire, différents gènes sont impliqués selon différentes voies (dégradations de protéines, métabolisme lipidique, réponse immunitaire et métabolisme de l'APP).La phase cellulaire se concentre sur les perturbations des interactions neurones-glie. Abréviations : SORL1 Sortilin-related receptor 1, PICALM Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein, LRP1 Low density lipoprotein receptor-related protein 1, ABCA1/7 ATP-binding cassette 1/7, CLU/APOJ Clusterin, BIN1 Bridging Integrator 1, RAGE Receptor for advanced glycation endproducts, EPHA1 Ephrine A1, MS4A Membrane-spanning 4-domain family, INPP5D Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase D, HLA-DRB5-DRB1 HLA Class II Histocompatibility Antigen DRB1/5 Beta Chain, CR1 complement C3b/C4b receptor 1, CD33 sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 3, TREM2 riggering receptor expressed on myeloid cells 2. D'après (De Strooper and Karran, 2016).

Selon les auteurs qui ont proposé le terme de phase cellulaire, l'enjeu actuel dans l'étude de la maladie d'Alzheimer serait donc de comprendre comment les interactions complexes entre les différents types cellulaires évoluent lors des phases précoces de la maladie. Selon eux, la

compréhension de cette pathologie se fera par l'intermédiaire de systèmes intégrant ces différents acteurs tels que les modèles de tranches aigues de cerveaux et les études *in vivo*.

2.2. Astrocytes et maladie d'Alzheimer.

2.2.1. Astrocytes et quelques maladies neurodégénératives.

Actuellement, peu de traitements efficaces sont disponibles pour stopper la progression des maladies neurodégénératives. L'hypothèse neuronale n'étant probablement pas suffisante pour décortiquer les mécanismes de ces pathologies, de récentes études ont tenté d'étudier l'implication des astrocytes dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives. Trois pathologies dans lesquelles la physiologie astrocytaire s'est avérée altérée seront décrites dans cette partie.

2.2.1.1. Maladie de Huntington.

La maladie de Huntington est causée principalement par l'accumulation de motifs CAG sur le gène codant pour la protéine huntingtine. Cette protéine, portera alors une expansion anormale de glutamine sur sa partie N-terminale, responsable des symptômes moteurs et cognitifs de la maladie (Ross et al., 2014; Saudou and Humbert, 2016).

Dans le striatum, l'huntingtine mutée s'accumule au niveau intracellulaire et cause notamment une diminution d'expression du canal $K_{ir}4.1$ astrocytaire. Cette diminution d'expression induit une augmentation du K^+ extracellulaire dépolarisant les neurones de projections épineux (MSN) (Tong et al., 2014). L'apport par vecteurs viraux de $K_{ir}4.1$ permet de restaurer la fonction de recapture du K^+ par les astrocytes et d'atténuer les dysfonctions des MSN. Dans un modèle de souris transgénique pour la maladie de Huntington, il a été observé une diminution de l'activité calcique astrocytaire associée à la diminution de $K_{ir}4.1$ et à une diminution d'expression de GLT-1 (Jiang et al., 2016). Cette diminution de GLT-1 induit des effets excitotoxiques dus aux défauts de recapture du glutamate. La restauration *in vivo* de l'expression de $K_{ir}4.1$ restaure également celle de GLT-1 et permet de normaliser l'activité calcique astrocytaire et la signalisation glutamatergique. Cibler les fonctions astrocytaire dans cette pathologie semble donc offrir de nouvelles perspectives thérapeutiques.

2.2.1.2. Maladie de Parkinson.

La diminution de transmission dopaminergique, due à la perte des neurones dopaminergiques de la substance noire compacte, est responsable des troubles moteurs et cognitifs de la maladie de Parkinson (Aarsland et al., 2009; Hornykiewicz, 1975; Miller and DeLong, 1988).

Chez un modèle de singe parkinsonien, une diminution de la densité des épines dendritiques est observée au niveau des MSN du striatum (Villalba and Smith, 2013). En parallèle, les auteurs ont observé une augmentation de l'enrobage des synapses par les prolongements astrocytaires périsynaptiques. Le rôle fonctionnel de cette augmentation du recouvrement n'a pas été clairement établi, mais elle permettrait de préserver l'intégrité des synapses et de diminuer les phénomènes d'excitotoxicité liés au glutamate.

Lors de mon stage de Master 2, grâce à l'utilisation d'un modèle de blocage pharmacologique de la transmission dopaminergique, nous avons mis en évidence une augmentation de l'activité calcique astrocytaire spontanée ainsi qu'une augmentation de la synchronie de ces activités au sein du réseau astrocytaire de la substance noire réticulée, SNr (Bosson et al. 2015 article disponible en annexe). Dans cette étude, l'utilisation de la stimulation à haute fréquence du noyau sous-thalamique (traitement chirurgicale des formes sévères de la maladie) a permis de restaurer l'activité calcique astrocytaire et la synchronisation du réseau astrocytaire à leurs niveaux de base. En parallèle, j'ai mis en évidence dans un modèle lésionnel à la 6-OHDA (hydroxydopamine injectée par stéréotaxie dans la substance noire compacte) des remodelages structuraux des prolongements périsynaptiques astrocytaires impliqués dans l'enrobage des synapses glutamatergiques de la SNr. Les astrocytes semblent donc être impliqués dans la plasticité synaptique structurale et fonctionnelle suite à une déplétion en dopamine et pourraient supporter ou compenser certains mécanismes physiopathologiques de la maladie de Parkinson.

2.2.1.3. Syndrome de Down (trisomie 21).

Cette pathologie est plutôt caractérisée par des anomalies neurodéveloppementales plutôt que par une réelle neurodégénérescence liée à l'âge. Néanmoins ce syndrome partage quelques similitudes avec la maladie d'Alzheimer.

La trisomie du chromosome 21 place ce syndrome comme principale cause génétique de retard mental (Graber et al., 2012). La caractéristique neuronale du syndrome de Down, est une diminution du nombre d'épines dendritiques. De plus, ces épines présentent souvent une morphologie allongée et tortueuse chez les adultes atteints du syndrome de Down qui semble corrélée au développement de maladie d'Alzheimer chez ces patients (Ferrer and Gullotta, 1990). Enfin, le gène codant pour la protéine APP se situe sur le chromosome 21. La possession de 3 copies de ce chromosome peut donc conduire à une surexpression d'APP et par conséquent d' A β_{1-42} (Hamlett et al., 2016).

Les astrocytes ont été impliqués dans cette pathologie au travers d'études sur des modèles de co-cultures neurone/astrocyte. La thrombospondine-1 (TSP-1) serait moins sécrétée par les astrocytes induisant une diminution de densité des épines et des altérations morphologiques (Garcia et al., 2010). Ce phénomène peut être reversé par ajout exogène de TSP-1, cependant il n'a pas été déterminé si l'ajout ou la surexpression de TSP-1 permet également de réduire les atteintes morphologiques des épines *in vivo*. Il a également été mis en évidence, que les astrocytes issus de cellules pluripotentes induites (iPSC) de patients atteints du syndrome de Down, sont réactifs. En effet, il a été mis en évidence par immunohistochimie une augmentation des marquages des protéines GFAP et S100 β (Chen et al., 2014). Les astrocytes, dans le contexte de cette pathologie, possèdent un déficit de la sécrétion de la protéine APP associé à des dysfonctions mitochondriales pouvant conduire à une augmentation d'A β_{1-42} (Busciglio et al., 2002).

2.3. Astrocytes et $A\beta$

Par opposition au nombre d'études neuronales, les astrocytes sont très peu étudiés dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. Pourtant, comme l'évoque la description récente de la phase cellulaire de la maladie d'Alzheimer, les interactions neurones-glie, et notamment les interactions neurones-astrocytes, pourraient avoir un rôle primordial face à la toxicité d'A β . Cette partie présentera les principales études s'intéressant aux implications astrocytaires dans le contexte de la maladie d'Alzheimer.

2.3.1. Altérations morphologiques astrocytaires en présence d'Aβ.

L'astrogliose est un changement morphologique astrocytaire qui s'observe lors de différentes condition de stress (Burda and Sofroniew, 2014; Osborn et al., 2015). Ce changement morphologique se traduit principalement par une augmentation d'expression de deux protéines, la GFAP et S100 β , et il s'accompagne d'une hypertrophie astrocytaire. L'étude de cerveaux *post-mortem* de patients atteints de la maladie d'Alzheimer a révélé la présence de cette astrogliose (Meda et al., 2001; Verkhratsky et al., 2016a). Une étude observe une corrélation entre l'augmentation d'expression de la GFAP et les stades de Braak précédemment décrits mais pas entre la quantité d'A β extracellulaire et l'astrogliose (Simpson et al., 2010). D'autres études décrivent cependant des mécanismes d'élimination de l'A β_{1-42} dépendant de l'astrogliose (Kraft et al., 2013; Wyss-Coray et al., 2003). Les astrocytes sont fortement impliqués dans la dégradation et l'élimination de l'A β (pour revue voir Ries & Sastre 2016). En effet, les astrocytes produisent différentes protéases capables de dégrader les

formes monomériques et oligomériques d'A β telles que l'enzyme de dégradation de l'insuline, la néprilisyne (pour les astrocytes réactifs) et les enzymes de conversion de l'endothéline. D'autres protéases interviennent également telles que l'activateur du plasminogène, l'enzyme de conversion de l'angiotensine ainsi que des metalloprotéinases. Les astrocytes utilisent également des chaperonnes et des apolipoprotéines pour dégrader l'A β . Enfin, les astrocytes seraient capable *via* le système glymphatique (Morris et al., 2014), ainsi que la régulation des échanges entre le liquide cérébrospinal et le liquide interstitiel durant le sommeil, d'éliminer le peptide A β du SNC (Xie et al., 2013). Les astrocytes semblent donc représenter un premier mécanisme de défense pour contrer la toxicité d'A β .

Sur des modèles de culture primaire d'astrocytes corticaux de rat et de tranches organotypiques d'hippocampes, l'incubation de 5 à 10 μ M d'A β_{1-42} pendant 24 h induit une augmentation d'expression de la GFAP (Alberdi et al., 2013; Garwood et al., 2011). Cependant, l'étude de modèles animaux transgéniques pour la maladie d'Alzheimer a révélé que l'astrogliose n'est pas un processus uniforme et évolue selon un décours spatio-temporel plus complexe (Figure 21). Chez la souris triple transgénique (3Tg, portant la mutation Tau_{P301L}, APP_{swe}, PS1_{M146V}, et conduisant à la surexpression $d'A\beta_{1-42}$ et l'hyperphosphorylation de Tau) une atrophie astrocytaire, basée sur l'étude de marquages immunohistochimiques de la GFAP, a été observée au niveau du cortex préfrontal (à partir de 3 jusqu'à 18 mois Kulijewicz-Nawrot et al. 2012) et du cortex entorhinal (à partir d'un mois Yeh et al. 2011). Dans une autre étude utilisant la souris 3Tg, il a été décrit une atrophie concomitante d'une hypertrophie astrocytaire (Olabarria et al., 2010). L'atrophie est présente au niveau du gyrus denté de l'hippocampe à partir de 6 mois jusqu'à 18 mois tandis qu'une hypertrophie tardive apparait au niveau de CA1 à 18 mois à proximité des plaques amyloïdes.

L'atrophie astrocytaire semble donc précéder l'hypertrophie dans des modèles animaux de la maladie d'Alzheimer. On peut donc imaginer une diminution du recouvrement synaptique par les astrocytes lors des phases d'atrophie, conduisant à une excitotoxicité et à des processus inflammatoires induisant, à terme, l'astrogliose. L'étude des astrocytes dans la maladie d'Alzheimer est un domaine certes grandissant, mais encore à l'aube de son développement. Ainsi, se justifie l'étude de l'astrogliose, qui est un marqueur de la souffrance cellulaire lors de contextes pathologiques. Cependant, au regard de la complexité astrocytaire, il serait intéressant d'étudier d'autres changements morphologiques grâce aux avancées technologiques telles que la super résolution, directement au niveau des prolongements fins astrocytaires.

83



Figure 21 Décours spatio-temporel des changements morphologiques astrocytaire basés sur l'étude de l'expression de la GFAP. Cette figure regroupe les données disponibles pour l'évolution des plaques amyloïdes, de l'atrophie et l'hypertrophie astrocytaire observée dans le modèle de souris transgénique 3Tg. EC cortex entorhinal, DG gyrus denté, CA1 corne d'amont 1.

2.3.2. Signalisation calcique astrocytaire en présence d'Aβ.

De nombreuses études basées sur l'utilisation d'astrocytes en culture ont démontré que l'apport exogène de formes oligomériques solubles du peptide $A\beta_{1-42}$ induisent des modifications des concentrations de calcium intracellulaire (pour revue voir Verkhratsky, Zorec, et al. 2016; Verkhratsky, Rodríguez-Arellano, et al. 2016).

En 2010, Chow et collaborateurs observent, grâce à l'utilisation de la sonde calcique fluorescente Fluo-4 AM, que 5 μ M d'A β_{1-42} appliquées sur des cultures primaires d'astrocytes de rat induisent, dès 15 minutes d'incubation, une augmentation de la fréquence des activités calciques somatiques ainsi que de la proportion d'astrocytes présentant au moins une activité calcique (Chow et al., 2010). L'application d'A β_{1-42} induit également la propagation de vagues calciques sur ces cultures (**Figure 22 A**).

En 2013, toujours sur cultures primaires d'astrocytes de rat, une étude montre que 100 nM d'A β_{1-42} incubés pendant 4 à 6 h suffisent à augmenter la concentration cytosolique de calcium astrocytaire (Lim et al., 2013). L'utilisation de la sonde calcique ratiométrique Fura-2 AM a permis de mettre en évidence que cette concentration cytosolique basale double en présence d'A β_{1-42} (50 nM *vs.* 100-150 nM en présence d'A β_{1-42}). Après 24 h d'incubation, une augmentation de l'expression des ARNm du récepteur mGluR5 astrocytaire a également été observée par Rt-PCR. Ce dernier résultat fut confirmé par l'augmentation de l'immunoréactivité pour ce récepteur sur les cerveaux *post mortem* de patients (Lim et al., 2013). Cette augmentation d'expression du récepteur mGluR5 est également retrouvée à

proximité des plaques amyloïdes dans le cerveau de la souris transgénique APP_{swe}/PS1_{dE9} (Shrivastava et al., 2013). Cette étude décrit en parallèle un regroupement des récepteurs mGluR5, suite à l'incubation d'astrocytes corticaux de rat avec 100 nM d'A β_{1-42} pendant 5 à 60 minutes. La présence d'A β_{1-42} induit de façon concomitante un blocage de diffusion membranaire du récepteur mGluR5 (identifié par la technique du *quantom dot based single particle tracking*). De plus, les oligomères d'A β induisent l'activation du récepteur mGluR5 ce qui conduit à la libération d'ATP par les astrocytes.

Il a également été établi un lien entre la signalisation glutamatergique et la neurotoxicité d'A β impliquant directement le partenaire (Talantova et al., 2013). Sur des co-cultures de neurones et d'astrocytes corticaux de rat, l'application de faibles quantités d'A β_{1-42} (de 55 pM à 250 nM) induit une libération de glutamate par les astrocytes, suite à l'activation du récepteur α 7nAChR. La libération de glutamate astrocytaire, détectée par un senseur du glutamate (SuperGluSnFR), est ensuite responsable d'une activation des récepteurs NMDA extra synaptiques neuronaux. L'activation de ces récepteurs extra synaptiques conduit à une entrée de Ca²⁺ au niveau neuronal, la diminution de l'activité synaptique et la production de NO (oxyde nitrique, espèce réactive azotée). Ceci résulte en une excitotoxicité conduisant à la perte synaptique.

Ces différentes études, ainsi que d'autres (pour revue voir Verkhratsky, Zorec, et al. 2016; Verkhratsky, Rodríguez-Arellano, et al. 2016), ont permis grâce à l'utilisation de systèmes simplifiés, d'affirmer et de décrypter finement une implication de la signalisation calcique astrocytaire dans la maladie d'Alzheimer. De plus, en 2009, l'implication des astrocytes dans la maladie d'Alzheimer a été étudiée de façon plus intégrée, dans un modèle in vivo, au niveau du cortex de souris APP_{swe}/PS1_{dE9} (Kuchibhotla et al., 2009). Grâce à l'imagerie biphotonique, Kuchibhotla et collaborateurs ont enregistré l'activité calcique somatique astrocytaire corticale *in vivo* en fonction de la proximité des plaques amyloïdes. Ils ont ainsi mis en évidence que la concentration basale de calcium intracellulaire est plus élevée chez les souris APP_{swe}/PS1_{dE9} que chez la souche sauvage (WT), et ce, indépendamment de la proximité des plaques amyloïdes. De manière intéressante, les souris APP_{swe}/PS1_{dE9} (âgées de 6 à 8 mois) présentent une augmentation de la fréquence des activités spontanées astrocytaires, indépendamment de l'activité neuronale (l'augmentation de fréquence étant toujours observée en présence de TTX). Ainsi, cette étude suggère une action directe d'Aβ sur les astrocytes, qui ne nécessite pas de relais neuronal. Cette étude décrit également une synchronisation des activités calciques spontanées chez les souris APP_{swe}/PS1_{dE9}. Enfin, la

Maladie d'Alzheimer et astrocytes

présence de fortes concentrations d'A β_{1-42} chez ces animaux âgés semble être responsable de l'apparition de vagues calciques *in vivo* (**Figure 22 B et C**). L'apparition de ces vagues calciques semble corrélée à la proximité d'un astrocyte (appelé initiateur) avec une plaque amyloïde. Cette étude *in vivo* démontre qu'en plus de la réponse neuronale à la toxicité du peptide amyloïde β à long terme, s'ajoute une forte réaction du réseau astrocytaire.



Figure 22 Propagation de vagues calciques en présence d'A $\beta_{1.42}$. (**A**) Détection d'une vague calcique sur culture d'astrocytes de rat chargés avec l'indicateur calcique Fluo-4 AM en présence de 5 µM d' d'A $\beta_{1.42}$. Le code couleur représente la projection temporelle en seconde de la propagation d'une vague calcique. (**B**) Propagation de vagues calciques *in vivo* dans un modèle de souris APP_{swe}/PS1_{dE9}. Le code couleur représente la séquence temporelle, les flèches la propagation spatiale. En rose, sont représentées les plaques amyloïdes révélées par le colorant intravital methoxy-XO4. (**C**) L'astrocyte initiateur de la vague calcique se situe plus près d'une plaque que la moyenne des astrocytes actifs et inactifs. (A) d'après (Chow et al., 2010) (B, C) d'après (Kuchibhotla et al., 2009).

En parallèle, une étude récente, réalisée sur des tranches de cerveau de souris transgénique (APP/PS-1 21 âgées de 5 à 9 mois) a mis en évidence une hyperactivité calcique astrocytaire à proximité des plaques amyloïdes médiée par la signalisation purinergique (Delekate et al., 2014). Dans cette étude, il a été observé un emballement de l'activité calcique astrocytaire au niveau du cortex somatosensoriel des souris transgéniques pour la maladie d'Alzheimer (**Figure 23**). Cette hyperactivité somatique est dépendante de la distance avec les plaques amyloïdes et est médiée par la transmission purinergique. L'inhibition du récepteur P2Y₁ ainsi que le découplage des jonctions gaps (afin de bloquer la transmission paracrine de l'ATP) permettent ainsi de normaliser cette hyperactivité calcique astrocytaire.

Enfin, en 2016, une étude a mis en évidence une implication du canal TRPA1 dans les mécanismes inflammatoires induits par la surproduction d'A β_{1-42} (Lee et al., 2016). En utilisant le modèle de souris APP_{swe}/PS1_{dE9}, une augmentation significative de l'expression de TRPA1 (détectée par *western-blot*) a été décrite chez les souris transgéniques à 8 mois.



Figure 23 Hyperactivité astrocytaire chez la souris APP/PS1-21. (**A**, **B**) Les astrocytes sont identifiés avec l'indicateur calcique OGB-1 AM et la SR101. Les plaques sont identifiées avec le marqueur methoxy-XO4. Les traces vertes représentent les variations de fluorescence des astrocytes inactifs et actifs, les hyperactifs sont représentés en rouge. (**C**, **D**) Histogrammes de fréquences présentant la distribution des fréquences d'activités calciques chez les souris APP/PS1-21 en rouge, et WT en bleu. L'histogramme rouge permet d'observer une distribution plus étalée, regroupant une plus large gamme de fréquences. Les proportions associées sont représentées par les camemberts. D'après (Delekate et al., 2014).

Enfin, en 2016, une étude a mis en évidence une implication du canal TRPA1 dans les mécanismes inflammatoires induits par la surproduction d'A β_{1-42} (Lee et al., 2016). En utilisant le modèle de souris APP_{swe}/PS1_{dE9}, une augmentation significative de l'expression de TRPA1 (détectée par *western-blot*) a été décrite chez les souris transgéniques à 8 mois.

Ces souris présentent des déficits cognitifs ainsi qu'une production de cytokines proinflammatoires (IL-1 β , IL-6 et IL-4). Le croisement de ces souris avec une souche de souris TRPA1^{-/-} permet de limiter, dans cette étude, les dépôts amyloïdes, de diminuer les déficits cognitifs (lors des tests du labyrinthe en Y et de la piscine de Morris) et de diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires. Cependant, et de manière surprenante, cette lignée de souris (APP_{swe}/PS1_{dE9} x TRPA1^{-/-}) présente une augmentation de l'astrogliose par rapport à la souche APP_{swe}/PS1_{dE9}. Les auteurs émettent l'hypothèse que ces changements résultent d'une activité calcique modifiée par la présence d'A β_{1-42} . En effet, ils observent sur culture d'astrocytes, une augmentation de l'activité calcique astrocytaire inhibée par l'utilisation d'un antagoniste spécifique du canal TRPA1.

Ces différentes études (résumées dans le **Tableau 6**) suggèrent donc très fortement une implication astrocytaire dans la maladie d'Alzheimer. Cette implication semble passer par différents mécanismes, relayés par des modifications morphologiques et fonctionnelles. La signalisation calcique astrocytaire semble elle aussi une cible de premier ordre pour les formes oligomériques solubles du peptide amyloïde β .

C'est dans ce contexte que s'est inscrit ce travail de thèse.

Tableau 6 Résumé des effets d'Aß sur la signalisation astrocytaire.

Etudes	Modèles	Exposition Aß	Réponse calcique	Astrogliose	Cible d'Aß	Acteurs moléculaires en aval
Kuchibhotla 2009	<i>In vivo</i> cortex Souris APP _{swe} /PS1 _{dE9} (6 à 8 mois)	Surproduction d' A _{β142} chez la souris transgénique	[Ca ²⁺]i augmente Augmentation de la fréquence des activités somatiques Observation de vagues calciques à proximité des plaques	Supposée, présence de plaques amyloïdes	Non déterminé	Non déterminé
Chow 2010	Cultures primaires astrocytes corticaux (rat)	$5~\mu M~A\beta_{142}~15$ min	Augmentation de la proportion d'astrocytes actifs Augmentation de la fréquence des activités somatiques Observation de vagues calciques	Augmentation du marquage GFAP et S100B	Non déterminé	Non déterminé
Lim 2013	Cultures primaires astrocytes corticaux (rat)	100 nM Aβ ₁₄₂ 4 à 6 h Cerveaux post mortem	[Ca ²⁺]i double Augmentation de la proportion d'astrocytes actifs en culture	Supposée, longue incubation Confirmée sur cerveaux <i>post mortem</i>	Indirect, calicneurine, NF-kB, NFAT	Augmentation ARNm mGluR5 et IP ₃ R2
Shrivastava 2013	Cultures primaires astrocytes corticaux (rat) APP _{swe} /PS1 _{dE9} (6 à 16 mois)	100 nM Aβ ₁₄₂ 5 à 60 min	Augmentation de la proportion d'astrocytes actifs en culture	Augmentation du marquage GFAP à 6 et 16 mois chez souris transgéniques	mGluR5	Libération astrocytaire d'ATP
Talantova 2013	Co-cultures astrocytes corticaux (rat)	55 pM à 250 nM Αβ ₁₄₂	[Ca ²⁺]i augmente	Non déterminé	a7nAChR	Libération de glutamate astrocytaire induisant l'activation des NMDAr extra synaptiques
Delekate 2014	In vivo cortex somatosensoriel	Surproduction d' Aβ ₁₄₂ chez la souris transgénique	Augmentation de la proportion d'astrocytes actifs Augmentation de la fréquence des activités somatiques	Augmentation du marquage GFAP	P2Y1	Non déterminé
Lim 2013	Cultures primaires astrocytes corticaux et hippocampiques Souris APP _{swe} /PS1 _{dE9} (8 mois)	$2 \ \mu M \ A\beta_{1.42} \ 0 \ a \ 60 \ min$	[Ca²+]i augmente	Augmentation du marquage GFAP	TRPA1	Production de cytokines inflammatoires par les astrocytes

3. Objectifs

L'étude de l'implication des astrocytes dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer suscite donc un intérêt croissant. Cependant, l'ensemble des études actuelles se focalisent sur les stades tardifs de la pathologie c'est à dire lorsque les plaques amyloïdes sont déjà présentes dans le cerveau. Or, à ces stades tardifs, les astrocytes sont déjà dans un état physiopathologique particulier (souvent en astrogliose) et impliqués dans des processus inflammatoires déjà bien stabilisés. Il nous a semblé important de nous intéresser aux premières étapes de la pathologie, à des stades précoces qui sont encore asymptomatiques mais où la toxicité du peptide est déjà avérée, et ce avant l'apparition des plaques et de l'astrogliose. A ces stades précoces, il est connu que le peptide Aβ sous sa forme oligomérique est d'ores et déjà pourvu d'une toxicité qui affecte à la fois la structure et la fonction des synapses (Becerril-Ortega et al., 2014; Frandemiche et al., 2014; Kervern et al., 2012; Rush and Buisson, 2014). Nous avons donc cherché à mettre en évidence l'implication des astrocytes voisins dans cette toxicité synaptique. Pour cela, nous avons étudié l'excitabilité calcique astrocytaire dans un modèle de tranche aigue d'hippocampe, au sein du *stratum radiatum*.

Etant donné la complexité de l'architecture et de la signalisation astrocytaire, nous avons étudié en parallèle le fonctionnement en réseau de ces cellules et la signalisation calcique des compartiments de l'arborisation astrocytaire avec pour objectifs de répondre à différentes questions :

- Comment l'activité calcique du réseau astrocytaire et des compartiments de l'arborisation astrocytaire évolue en présence de faibles concentrations d'Aβo au sein du *stratum radiatum* de l'hippocampe ?
- ii. Quels sont les acteurs moléculaires impliqués dans cette signalisation calcique ?
- iii. Est-ce que les modifications de l'activité calcique induites par $A\beta_{1-42}$ peuvent avoir des répercussions (bénéfiques ou délétères) sur l'activité neuronale à proximité ?

Objectifs

En conséquence, les premières étapes de mon projet de thèse ont consisté à développer des méthodes d'imagerie permettant d'étudier les modifications de l'activité calcique astrocytaire induites par les formes oligomériques solubles d'A β_{1-42} (A β_0) à faible concentration (100 nM) et sur des temps courts, sur tranches aigues de cerveau de souris.

Nous avons étudié l'activité calcique au niveau du réseau astrocytaire par des méthodes de chargements globales. Par contre, les prolongements fins ne sont pas accessibles par ces techniques. J'ai donc adapté une méthode utilisant la pipette de patch pour charger un astrocyte unique avec une sonde calcique chimique (Fluo-4) (Di Castro et al., 2011; Nett et al., 2002). Cette méthode a permis d'avoir accès aux prolongements fins de cette cellule complexe et d'enregistrer les activités calciques compartimentées au sein de l'arborisation complexe de ces cellules.

En parallèle, nous avons utilisé des approches pharmacologiques afin d'identifier les acteurs de la signalisation astrocytaire impliqués dans les effets précoces d'Aβo.

Enfin, par mesure de l'activité synaptique spontanée des neurones pyramidaux de CA1 sur tranche aigue d'hippocampe de souris, nous avons évalué les répercussions neuronales de l'impact d'Aβo sur l'activité calcique astrocytaire.

Ces études ont été menées sur des souris saines et des souris transgéniques modèles de la maladie d'Alzheimer, les souris APP/PS1-21.

4. Matériel et méthodes

L'ensemble du matériel et des méthodes utilisés dans ce projet sont décrits dans l'article qui a découlé de ce travail et qui est présenté dans la partie suivante. Je vais simplement détailler ici la technique principale qui m'a permis d'accéder à la signalisation calcique des compartiments de l'arborisation astrocytaire.

4.1. Description de la méthode de chargement d'un astrocyte unique par le Fluo-4.

L'électrophysiologie définit l'étude des phénomènes électriques et électrochimiques qui se produisent dans les tissus ou les cellules. Parmi les techniques d'électrophysiologie, la méthode du patch-clamp, mise au point en 1976 par Erwin Neher et Bert Sakmann, permet d'enregistrer l'activité des cellules excitables par mesure des changements du potentiel membranaire et des mouvements ioniques (Neher and Sakmann, 1976). Parmi les différentes variantes du patch-clamp, une configuration dite en cellule entière, permet d'avoir accès à tous les mouvements ioniques de la cellule « patchée ».

Le principe de la technique repose sur l'utilisation de deux électrodes : l'électrode d'enregistrement et l'électrode de référence. L'électrode d'enregistrement est placée dans une pipette de verre remplie d'un liquide conducteur (dont la composition est proche de celle du milieu intra- ou extracellulaire selon les configurations) et l'électrode de référence est placée dans le milieu extracellulaire. Les mesures de différences de potentiel entre ces deux électrodes permettent alors de mesurer des courants ou des voltages. La technique s'effectue en différentes étapes. La pipette de verre contenant l'électrode d'enregistrement est tout d'abord mise en contact étanche avec la cellule à enregistrer. Cette première étape permet d'obtenir la configuration cellule attachée où les variations de potentiels membranaires peuvent être détectées. Par la suite, la rupture de la portion membranaire située sous la pipette permet d'atteindre la configuration cellule entière.

Les astrocytes étant plutôt silencieux du point de vue de l'activité électrique, certains groupes de recherche ont eu l'idée de détourner cette technique, afin d'utiliser la configuration en cellule entière pour délivrer des petites molécules à la cellule patchée (Di Castro et al., 2011; Nett et al., 2002). L'idée, pour les astrocytes, était de délivrer un indicateur calcique à un

Matériel et méthodes

astrocyte unique afin de pouvoir étudier son activité calcique jusque dans ses prolongements les plus distaux.

Cette technique (Figure 24 A-C) consiste à remplir la pipette d'enregistrement avec une solution proche du milieu intracellulaire astrocytaire supplémentée de 200 µM de Fluo-4. Après le passage en configuration cellule attachée, le Fluo-4 va diffuser passivement dans l'astrocyte. Tous les indicateurs calciques, même s'ils interagissent de façon dynamique avec l'ion Ca²⁺ (le K_d du Fluo-4 pour le calcium est de 345 nM) et respectent ainsi au mieux la dynamique des fluctuations calciques, tamponnent légèrement le Ca²⁺. Afin de minimiser l'effet tampon du Fluo-4 et également d'éviter une dialyse du milieu intracellulaire, la solution intrapipette ne contient pas d'EGTA et les astrocytes ne sont maintenus en configuration cellule entière qu'entre 2 min 30 et 5 min au maximum. Ensuite, la pipette de patch est minutieusement retirée, afin de permettre à la membrane plasmique de à l'astrocyte de se refermer. L'acquisition par microscopie confocale est réalisée 15 à 20 min après le retrait de la pipette, pour permettre au Fluo-4 de diffuser dans l'ensemble de l'arborisation de l'astrocyte avec une diffusion du Fluo-4 équivalente voire supérieure à celle de la sulforhodamine 101. Cette méthode s'est avérée très pertinente pour avoir accès à la totalité de l'arborisation astrocytaire (Figure 25). Les images sont acquises dans un seul plan focal, à 1,2 s d'intervalle et sur une période de 5 min.

D'autres méthodes, basées sur l'utilisation de GECI (sonde calcique génétique couplé à des molécules fluorescentes) permettent également d'avoir accès à l'activité calcique astrocytaire dans les prolongements fins. Cependant, ces techniques comportent certains biais incompatibles avec les objectifs de ce travail de thèse. Tout d'abord ces sondes nécessitent d'être injectées aux animaux par vecteurs viraux ou par électroporation. Ces deux méthodes sont invasives et peuvent induire l'apparition d'astrogliose réactionnelle. L'expression de ces sondes, sous le contrôle d'un promoteur astrocytaire induit une expression dans plusieurs astrocytes, il devient alors difficile de distinguer l'origine des prolongements fins entre plusieurs astrocytes. Enfin les caractéristiques de ces sondes telles que leur rendement de fluorescence et leur ratio signal sur bruit sont, pour l'instant moins optimums que celles de la sonde calcique chimique Fluo-4 (Thomas et al., 2000).

Nous avons ensuite mis au point une méthode d'analyse des signaux calciques, qui soit adaptée à la quantité d'informations fournies par cette méthode. L'étude de Di Castro et collaborateurs avait mis en évidence une compartimentation de l'activité calcique dans les prolongements, délimitée par des territoires d'environ 1 μ m². Nous avons donc placé manuellement, le long des prolongements accessibles dans le plan focal imagé, des régions d'intérêt (ROI) d'approximativement 1 μ m² (**Figure 24 E** panneau de droite) ainsi qu'une ROI somatique. Le nombre de territoires présentant une activité calcique ainsi que la fréquence des activités ont été enregistrés à l'aide d'un logiciel permettant d'analyser l'activité calcique, basé sur le calcul du ratio de fluorescence Δ F/F₀, où F₀ est déterminée à partir de l'intensité de fluorescence moyenne de toutes les ROI (Platel et al., 2007).



Neurones





Figure 24 Méthode d'étude de l'activité calcique astrocytaire sur tranche aigue d'hippocampe au niveau des prolongements astrocytaires. (A) Représentation schématique de l'hippocampe, la zone verte correspond au *stratum radiatum* de l'hippocampe au sein de laquelle les astrocytes ont été imagés. (B) Visualisation d'un astrocyte en configuration cellule entière. Les pointillés délimitent la couche des neurones pyramidaux de CA1. La pointe de flèche indique la pipette de patch. La flèche indique le soma de l'astrocyte patché. (C) Visualisation 3D du volume d'un astrocyte chargé en Fluo-4 par la pipette de patch et reconstitué à l'aide du module 3D Viewer d'ImageJ. (D) Projection en z en pseudo couleurs du volume de l'astrocyte chargé avec le Fluo-4. (E) Image en 2D de microscopie confocale d'un chargement des prolongements astrocytaire (gauche) et des microdomaines associés (droite). (F) Enregistrement de variations de fluorescence reflétant l'activité calcique au sein de certains microdomaines. Les activités surlignées en rouge représentent des activités qui se propagent le long de plusieurs microdomaines, les bleues sont des activités focales.

Nous avons également distingué les activités qui se propagent au sein de 4 microdomaines et plus (dites *expanded*) et celles ne se propageant pas au-delà de 3 microdomaines (dites *focal*) (**Figure 24 F**). Ces deux types d'activités ont été décrits au niveau du *gyrus denté* par Di Castro et collaborateurs et ne semblent pas faire intervenir les mêmes régulations. Les activités *focal* semblent indépendantes des potentiels d'action (persistent en présence de TTX), tandis que les activités *expanded* semblent dépendre des potentiels d'action des neurones voisins (Di Castro et al., 2011). A la fin de chaque enregistrement, une série d'images sur plusieurs plans focaux (avec un pas de 0,5 μ m) a été effectuée afin d'avoir accès à l'ensemble du volume de diffusion du Fluo-4 dans l'arborisation astrocytaire (**Figure 25**).

Cette technique, représente le fil conducteur des travaux de ce manuscrit. Elle a été associée à des études de l'activité du réseau astrocytaire par des techniques de chargement globale (Fluo-4 AM), des études électrophysiologiques de l'activité spontanée neuronale (enregistrement des courants excitateurs post-synaptiques EPSCs) et des marquages immunohistochimiques.



Figure 25 Exemples de projections en z du volume astrocytaire révélé par le chargement en Fluo-4 dans l'ensemble du territoire astrocytaire. Barre d'échelle : 10 µm.

5. Résultats

5.1. Article scientifique.

Les résultats de mes travaux de thèse sont présentés sous la forme d'un article scientifique, récemment soumis pour publication dans une revue à comité de lecture. Nous avons mis en place différentes stratégies pour répondre aux problématiques décrites dans la partie « objectifs ».

Au travers de cet article, nous avons décrit un impact très précoce d'Aβo sur l'activité calcique astrocytaire, à la fois au niveau du réseau et au niveau de l'arborisation astrocytaire. Nous avons également mis en évidence des modifications de l'activité synaptique neuronale, en lien avec les modifications d'activité calcique astrocytaire.

Ces résultats constituent la première démonstration d'une hyperactivité calcique astrocytaire induite par A\u00f3o sur tranche aigue de cerveau de souris, à faible concentration et sur des temps courts. Cette hyperactivité astrocytaire est retrouvée dès les premiers stades de surproduction du peptide amyloïde dans un modèle de souris transgénique pour la maladie d'Alzheimer (avant l'apparition de l'astrogliose et des plaques séniles). Ces effets n'avaient jamais été décrits à l'échelle des microdomaines de l'arborisation astrocytaire. Nous avons également identifié un acteur moléculaire, récemment impliqué dans la signalisation astrocytaire, comme une nouvelle cible d'A\u00f3\u00f6, le canal TRPA1. L'inhibition de ce canal permet de bloquer l'hyperactivité calcique astrocytaire ainsi que les perturbations précoces de l'activité synaptique. Par conséquent, garantir l'intégrité des interactions entre neurones et astrocytes semblent être un élément déterminant dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.

Ce travail met en lumière de nouvelles contributions astrocytaires dans les phases précoces de la maladie d'Alzheimer, dont la prise en compte offre de nouvelles opportunités dans le maintien d'une transmission synaptique efficace.

Astrocytic calcium hyperactivity and early synaptic dysfunction induced by oligomeric forms of amyloid-β peptide are mediated by TRPA1

Anthony Bosson^{1,2}, Adrien Paumier^{1,2}, Sylvie Boisseau^{1,2}, Muriel Jacquier-Sarlin^{1,2}, Alain Buisson^{1,2} and Mireille Albrieux^{1,2,*}

¹University Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences, GIN, F-38000 Grenoble, France

²Inserm, U1216, F-38000 Grenoble, France

* Correspondence and requests for materials should be addressed to M.A. (e-mail: mireille.albrieux@univ-grenoble-alpes.fr)

Article scientifique.

Abstract

Astrocytic alterations have been reported in Alzheimer's disease (AD) but astrocytes behavior and involvement in early phases of AD remained largely undefined. Here we measure astrocytic calcium activity in mouse CA1 hippocampus *stratum radiatum* at two different levels, the astrocytic network and the highly compartimentalized astrocytic arbor. We find that application of soluble A β oligomers induced fast and widespread calcium hyperactivity in the astrocytic network and the microdomains of the astrocyte arbor. We show that astrocyte hyperactivity is independent on neuronal activity and is repaired by TRPA1 channels blockade. Consequently, this TRPA1 channels-dependent hyperactivity influences neighboring CA1 neurons triggering an increase in glutamatergic spontaneous activity. Interestingly, astrocyte calcium hyperactivity also takes place at the beginning of A β production in an AD mouse model (APP/PS1-21 mouse) and depends on TRPA1 channels. Together, our data suggest that astrocyte is a frontline target of A β o and highlight a novel mechanism for the understanding of early synaptic dysregulation induced by soluble A β o species.

Résultats

Introduction

Formation of toxic amyloid- β (A β) species and their accumulation in plaques are key hallmarks in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) but it has now been recognized that, far ahead of plaques formation, soluble A β oligomers (A β o) are the pathology-triggering species¹. More specifically, A β o manage a progressive loss of synaptic connectivity leading to neurodegeneration. Astrocytes are important safeguards of synaptic function and it becomes increasingly evident that these cells accomplish a more important role in brain function than previously thought. The loss of synapses may reflect functional downfall of astrocytes. These cells possess receptors and signaling machinery for all known neurotransmitters thus sensing neuronal activity². They also actively secrete gliotransmitters such as ATP, glutamate, D-serine hence modulating activity of neuronal receptors^{3,4}. Consequently, through their involvement in the tripartite synapse, they both sense and modulate synaptic output⁵.

Unlike neurons, astrocytes are electrically non-excitable cells but they are equipped with numerous channels, receptors or exchangers triggering Ca^{2+} signals. Thus, astrocytic excitability is based on highly spatiotemporally coordinated fluctuations of intracellular Ca^{2+} concentration relying on plasmalemmal and intracellular channels⁶. Important progress has been made in studying astrocytes branches Ca^{2+} signaling since they are the primary sites for interactions with neurons⁷⁻⁹. Direct monitoring of Ca^{2+} dynamics in the processes of adult mouse hippocampal astrocytes has revealed intense local and compartmented activity that is dissociated from activity in the cell body⁸. However, until recently, it was difficult to specifically explore this astrocytic calcium activity since channels and receptors involved in astrocytic calcium signaling were commonly expressed in neurons. The discovery of TRPA1 channel as an important mediator of Ca^{2+} entry specifically expressed in *stratum radiatum* astrocytes^{10,11} provided new opportunity to explore astrocyte signaling and neuron-astrocyte interaction.

In late transgenic AD mouse models, *i.e.* in phases associated with plaques formation, it has been shown that astrocytic calcium activity dramatically increases, becomes synchronous nearby A β plaques and coordinates calcium signals at long distance¹². Within somatosensory cortex, this astrocyte hyperactivity around plaques is mediated by purinergic signaling¹³. Surprisingly, astrocytes behavior and reactions in early phases of AD remained largely undefined despite their probable involvement in the progressive loss of synaptic connectivity and in the complex and critical cellular phase of AD¹⁴.

In this work, we monitored astrocytic calcium activity within the CA1 *stratum radiatum* region of the mouse hippocampus both at a network level and at a single cell level, focusing

in the astrocytic arbor. We characterized spontaneous Ca^{2+} signaling properties at these two related levels and showed that A β o exposition induced at once a global and a local Ca^{2+} hyperactivity. We showed that this hyperactivity was independent on neuronal activity and was totally restored to physiological level by blocking TRPA1 channels. This TRPA1 channels-dependent influence of A β o on astrocyte activity consequently impacted neighboring CA1 neurons increasing glutamatergic spontaneous activity. In an AD mouse model, we found that astrocyte hyperactivity was an early phenomenon setting up at the onset of A β production and preceding TRPA1 channel overexpression. Overall, our data provide a novel mechanism for the understanding of early toxicity of soluble A β o species.

Résultats

Results

Ca²⁺ activity in astrocytic network and processes in mouse hippocampus

 Ca^{2+} signals encoding is known to be different in astrocytic cell body *versus* processes and involves different calcium sources such as internal stores release or external entry. Spatio-temporal Ca^{2+} activity characteristics within astrocyte correlate to specific function associated with different territories. Astrocytes not only operate as individual cells but also take part in functional network through gap-junction coupling allowing remote communication in delimited functional brain area. We studied astrocytic Ca^{2+} activity at once in the astrocytic network and in single cell microdomains on mouse hippocampal slices (P17-P23) by using two complementary imaging techniques: i) Fluo-4 AM bulk loading to record calcium activity in the astrocytic network and ii) whole-cell patch-clamp technique to load individual astrocytes with Fluo-4 dye giving access to single cell processes territory (Supplementary Fig. 1).

We analyzed signals by positioning regions of interest (ROIs) either in each cell body of Fluo-4 AM loaded astrocytes (20.0 \pm 1.3 ROIs by frame; n = 43 slices from 14 animals in physiological condition; Fig. 26a,b) or by subdividing the entire patch-clamp loaded territory into subregions of similar area (1 μ m²; 111.7 \pm 7.3 ROIs by astrocyte; n = 7 astrocytes from 6 animals in physiological condition; Fig. 26e,f). These subregions corresponded to functional microdomains as previously defined by Di Castro et al.⁸ since their size matched approximately the synaptic density in the neuropil region. We investigated some of the temporal properties of astrocytic Ca²⁺ signals (such as the proportion of active cells, the proportion of active microdomains, the frequency of events) and some of the spatial properties of Ca²⁺ signals within the astrocytic arbor (such as the events propagation).

In physiological condition, 49.1 ± 2.2 % of bulk loaded astrocytes were spontaneously active during a 5 min recording period (n = 43 slices from 14 animals) with a mean frequency of 0.49 ± 0.01 event/min (n = 817 astrocytes; Fig. 26c). Frequency histograms revealed that the occurrence of Ca²⁺ events in the astrocyte population was similar to a Poisson distribution with $\lambda = 1.85$ suggesting that spontaneous Ca²⁺ event within *stratum radiatum* was a stochastic phenomenon (Fig. 26d). Based on an *in vivo* study performed in mouse cortical astrocytes¹³, we classified astrocytes as inactive (0 event/min), active (0.2 - 0.6 event/min) and hyperactive (> 0.6 event/min). We observed a minority of hyperactive astrocytes (11 %) within mouse hippocampus *stratum radiatum* in physiological condition (Fig. 26d).

This spontaneous activity is independent on neuronal activity since TTX (500 nM) had no effect on either the proportion of active astrocytes or the frequency of calcium activity or the

proportion of active/hyperactive astrocyte (Fig. 27a,b,c). This therefore confirmed that the astrocytic network activity is totally autonomous within the mouse hippocampus *stratum radiatum*¹⁵.

In single patch-clamp loaded astrocyte, we had access to Ca^{2+} activity in a two-dimensional acquisition plane representing on average 1945.3 ± 140.1 µm² (n = 7 astrocytes). We analyzed spatio-temporal encoding of Ca^{2+} signals in 111.7 ± 7.3 microdomains within the astrocytic arbor. In physiological condition, 57.9 ± 4.8 % of these microdomains were active (*i.e.* at least 1 Ca^{2+} event) during a 5 min recording period with a mean activity frequency of 0.59 ± 0.01 event/min (n = 782 ROIs; Fig. 26g). As previously described in mouse dentate gyrus astrocytes⁸, we identified two types of Ca^{2+} events: "focal events" that are confined to 1 to 4 microdomains and "expanded events" appearing in more than 4 contiguous subregions (Fig. 1h; Supplementary Movie 1). Focal events were the large majority (67 %) occurring randomly in all subregions. Expanded events arose less often (33 %) and spread over 7.1 ± 0.4 µm². Within *stratum radiatum*, these two types of Ca^{2+} event were independent on neuronal action potentials since TTX application didn't affect either the proportion or the frequency of focal and expanded events (Fig. 27d,e).



Figure 26 Detection of global and compartimentalized Ca2+ events in astrocytes. (a) Fluo-4-loaded astrocytes in the stratum radiatum of a mouse coronal slice. Fluorescence variations were analyzed in astrocyte cell bodies (red square). (b) Example of typical fluorescence variations recorded in physiological condition. (c) Proportion of astrocytes displaying calcium activity during a 5-min recording. Each dot corresponds to individual value for each recorded slice (n = 43). (d) Frequency histogram showing the occurrence of Ca²⁺ events in the astrocyte population and the related theoretical Poisson distribution (grey curve). Pie chart representing inactive (0 event per min), active (0.2-0.6 event per min) and hyperactive (> 0.6 event per min) astrocytes in physiological condition. (e) Single patch-clamp Fluo-4-loaded astrocyte in the stratum radiatum of a mouse coronal slice. Fluorescence variations within processes were analyzed in subregions of ~1 μ m² (red square) in a single z-plane. (f) Time-lapse Ca²⁺ imaging in an astrocyte process showing an example of Ca²⁺ event. Time between frames, 15 s. The black curve corresponded to the fluorescence signal recorded in a selected ROI (red square, first image). (g) Proportion of subregions displaying a calcium activity during a 5-min recording. Each dot corresponds to individual value for each recorded astrocyte (n = 7). (h) Artificial color superposition of focal Ca²⁺ events (1-4 contiguous subregions, blue) and expanded Ca²⁺ events (> 4 contiguous subregions, red) occurring during a 5min recording in an astrocyte process, as defined by ⁸. Traces showing occurrence of Ca²⁺ peaks in contiguous subregions with blue and red highlights identifying focal (blue) and expanded (red) Ca2+ events respectively. In physiological condition, focal events represent the major part of Ca²⁺ events within the astrocytic processes.

Astrocytic Ca^{2+} signaling involves both internal Ca^{2+} stores and external Ca^{2+} entry. Within the astrocytic network, removal of external Ca^{2+} from the bath (ACSF - 0 Ca^{2+} - EGTA 1 mM) had no effect on the proportion of spontaneously active astrocytes (48.2 \pm 2.7 % in Ca²⁺-free medium vs 49.1 \pm 2.2 % in ACSF; n = 9 slices from 5 animals; p = 0.97) but aborted approximately 35 % of events within active cells (0.31 ± 0.02 event/min in Ca²⁺-free medium vs 0.48 ± 0.01 in physiological condition; n = 103 astrocytes; p < 0.0001) meaning that one third of somatic Ca²⁺ events depended on a Ca²⁺ entry (Fig. 27a,b,c). Particularly, the proportion of hyperactive/active astrocytes was strongly affected (3 % of hyperactive astrocytes versus 11 % in physiological condition; p < 0.001). Yet, location of internal stores is not uniformly distributed in the astrocytic territory since they are concentrated in cell body and thick processes, thin astrocytic processes being practically devoid of Ca^{2+} stores¹⁸. Consistently, we observed that removing external Ca^{2+} suppressed nearly all the compartmentalized Ca²⁺ transients in the astrocytic arbor (5.1 \pm 1.3 % active territories vs 57.8 ± 4.8 % in physiological condition; n = 7 astrocytes from 6 animals; p = 0.0006) and reduced the frequency of the residual signals $(0.41 \pm 0.01 \text{ event/min } vs 0.59 \pm 0.01 \text{ in})$ physiological condition; n = 687 ROIs; p = 0.04) (Fig. 27d,e).



Figure 27 Spontaneous Ca²⁺ events are fully autonomous and partly depend on external Ca²⁺ entry. (**a**, **b**) Within the astrocytic network, proportion of astrocytes displaying calcium activity and frequency of astrocyte calcium activity in physiological condition (grey; n = 43), under 500 nM TTX application (dark blue; n = 6) or in Ca²⁺-free medium (0 Ca; light blue; n = 9). Each dot corresponds to individual value for each recorded slice (proportion) or each recorded ROI (frequency). (**c**) Frequency histogram revealing that 500 nM TTX had no effect on the frequency distribution whereas significantly less astrocytes were hyperactive in Ca²⁺-free medium (0 Ca; light blue). (**d**, **e**) Within single astrocyte arbor, proportion of subregions displaying calcium activity and frequency of astrocyte calcium activity in physiological condition (grey; n = 7), under 500 nM TTX application (dark blue; n = 7) or in Ca²⁺-free medium (0 Ca; light blue; n = 7). Each dot corresponds to individual value for each recorded astrocyte (proportion) or each recorded ROI (frequency). Results are compared with the physiological condition with *, p < 0.05; **, p < 0.01 and ***, p < 0.001.

Astrocytes become hyperactive in presence of amyloid- β oligomers

To investigate the effect of soluble $A\beta_{1.42}$ oligomers (A β_0) on astrocytic calcium signaling, we perfused hippocampal slices with 100 nM of oligomeric forms of the peptide during 5 min before recording. At the network level, application of A β_0 resulted in a significant increase in the proportion of active astrocytes (69.7 ± 2.1 % *vs* 49.1 ± 2.2 % in physiological condition; *n* = 12 slices; *p* < 0.0001; Fig. 28a). Within active cells, the frequency of Ca²⁺ events also

significantly rose (0.83 ± 0.04 event/min vs 0.48 ± 0.01 event/min in physiological condition; n = 237 astrocytes; p < 0.0001; Fig. 28b). Frequency histogram was switched to high frequency and developed differently from the basal Poisson distribution ($\lambda = 4.39$; Fig. 28c). This suggested that Ca²⁺ event was not anymore a stochastic phenomenon but was managed by A β o. The fraction of hyperactive astrocyte (*i.e.* > 0.6 event/min) was significantly larger (41 % in A β o condition vs 11 % in physiological condition; p = 0.012; Fig. 28c). Thus, under application of 100 nM A β o, there is an increase in the population of hyperactive astrocytes at the expense of basal-active and -inactive astrocytes.

In individual patch-clamped astrocyte, application of A β o induced a significant increase of the fraction of active territories (75.8 ± 2.5 % vs 57.9 ± 4.8 % in physiological condition; n = 13 astrocytes; p = 0.0055; Fig. 28f) with no effect on the frequency of Ca²⁺ events within these microdomains (0.54 ± 0.01 vs 0.59 ± 0.02 event/min; n = 1806 ROIs; p = 0.178; Fig. 28g). Both focal and expanded events numbers were increased and the ratio of expanded/focal Ca²⁺ events was not significantly affected by A β o (41 % in A β o condition vs 33 % in physiological condition; p = 0.27; Supplementary Fig. 4a). However, expanded events size significantly increased compared to physiological condition (9.2 ± 0.5 μ m² vs 7.1 ± 0.4 μ m²; p = 0.045; Supplementary Fig. 4b).

Application of monomeric forms of $A\beta_{1-42}$ ($A\beta$ m) had no effect on either the proportion of active cells or the Ca²⁺ signal properties within cells confirming that only oligomeric forms of $A\beta$ were responsible for this Ca²⁺ hyperactivity (n = 14 slices from 4 animals; Supplementary Fig. 2). Major oligomers present in our samples were low-molecular weight oligomers (2- to 4- mers; Supplementary Fig. 2).

Thus, 100 nM A β o triggered astrocytic calcium hyperactivity within the *stratum radiatum* as soon as 5 minutes in the astrocytic network, manifested as an increase of the proportion of active cells along with an increase of the frequency of individual Ca²⁺ events. Interestingly, this global hyperactivity went along with a sustained increase of Ca²⁺ activity within astrocytic processes including an increase of the proportion of active microdomains together with an increase of the expanded events size in the astrocytic processes.


Figure 28 Extracellular A\$\overline\$ **application induces astrocytes hyperactivity.** (**a**, **b**) Within the astrocytic network, proportion of astrocytes displaying calcium activity and frequency of astrocyte calcium activity in physiological condition (grey; n = 43), under 100 nM A\$\overline\$ application (orange; n = 12), 100 nM A\$\overline\$ + 500 nM TTX co-application (dark blue; n = 8) and 100 nM A\$\overline\$ in Ca²⁺-free medium application (0 Ca; light blue; n = 8). (**c**, **d**, **e**) Frequency histogram revealing that significantly more astrocytes were hyperactive and less were inactive under 100 nM A\$\overline\$ o application or 100 nM A\$\overline\$ + 500 nM TTX co-application. A\$\overline\$ o-induced hyperactivity is abolished in Ca²⁺-free medium. Related theoretical Poisson distributions were shown accordingly. (**f**, **g**) Within single astrocyte arbor, proportion of subregions displaying calcium activity and frequency of astrocyte calcium activity in physiological condition (grey; n = 7), under 100 nM A\$\overline\$ application (orange; n = 13), 100 nM A\$\overline\$ + 500 nM TTX co-application (0 Ca; light blue; n = 5) and 100 nM A\$\overline\$ application (orange; n = 13), 100 nM A\$\overline\$ + 500 nM TTX co-application (0 Ca; light blue; n = 5). Results are compared with the physiological condition with *, p < 0.05; **, p < 0.01 and ***, p < 0.001 or the A\$\overline\$ condition with #, p < 0.05; ##, p < 0.01 and ###, p < 0.001.

A β o-induced astrocytic Ca²⁺ hyperactivity is independent on neuronal activity and involves external Ca²⁺ entry

A β o could potentially affect directly and/or indirectly Ca²⁺ signaling within astrocytes. In order to ascertain the neuronal part in the astrocyte hyperactivity, we co-applied 500 nM TTX with 100 nM A β o. In bulk loading condition, TTX had no effect on the A β -induced astrocytic

Ca²⁺ hyperactivity either in the proportion of active astrocytes (61.9 ± 2.2 %; n = 8 slices from 6 animals) or in the frequency of Ca²⁺ events (0.89 ± 0.04 event/min; n = 145 astrocytes; Fig. 28a,b). The proportion of hyperactive astrocytes was similar (p = 0.16) and the frequency distribution was not impacted by TTX application (Fig. 28d). In the same way, in individual patch-clamped astrocyte, the blockade of action potentials with TTX did not affect the A β o effect on the proportion of active territories (n = 5 astrocytes from 4 animals; p = 1.0) and on the frequency of Ca²⁺ events (n = 870 ROIs; p = 0.9; Fig. 28f,g). The enlarged size of expanded events was not reduced with TTX (9.0 ± 0.5 μ m²; p = 0.68; Supplementary Fig. 4). These data suggested that, within 5 min, A β o acts directly on astrocyte signaling independently of any neuronal activity.

To assess the external and/or internal origin of Ca^{2+} implicated in the A β o-induced Ca^{2+} hyperactivity, we applied 100 nM A β o in Ca^{2+} -free ACSF. Within the astrocytic network, we observed a 60 % decrease of the proportion of active astrocytes (28.1 ± 2.7 % active astrocytes in Ca^{2+} -free medium *versus* 69.7 ± 2.1 % in ACSF; n = 8 slices from 6 animals; p = 0.0002; Fig. 28a). The A β o-induced frequency increase of Ca^{2+} events was also strongly reduced in Ca^{2+} -free medium (0.30 ± 0.03 event/min; n = 73 astrocytes; p < 0.0001; Fig. 28b) and the proportion of hyperactive cells strongly declined (6 % *vs* 41 %; p < 0.0001; Fig. 28e). Within astrocytic processes, removing external Ca^{2+} avoided 1/3 of compartmentalized A β o-induced Ca^{2+} hyperactivity (25.2 ± 5.2 % of active territories; n = 5 astrocytes from 4 animals; p = 0.0016) and strongly reduced the frequency of the remaining signals (0.37 ± 0 01 event/min; n = 870 ROIs; p < 0.0001). The enlarged size of expanded events was however not significantly reduced in Ca^{2+} -free medium (7.7 ± 0.7 μ m²; p = 0.7). Overall, these data suggest that external Ca^{2+} entry is the main source of A β o-induced Ca^{2+} hyperactivity in the astrocytic processes and in the astrocytic network, superimposing a new signal encoding.

TRPA1 channels underlie Ca²⁺ hyperactivity induced by Aβo

Within astrocyte, Ca^{2+} entry can occur through astrocytic ligand-gated Ca^{2+} channels (ionotropic receptors), transient receptor potential (TRP) receptors and reverse operation of Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX). Astrocytic cationic ionotropic receptors (such as AMPA, NMDA or P2X receptors) have relatively low Ca²⁺ permeability (~1 to 3 pS) and accounted for ~4 % of fractional Ca²⁺ current⁶. Among TRP receptors, TRPA1 channels have been recently involved in regulating astrocyte basal Ca²⁺ levels in *stratum radiatum* of the hippocampus^{10,11}. Interestingly, TRPA1 channels have a relatively high Ca²⁺ permeability (~110 pS) accounting

for ~17 % of fractional Ca^{2+} current for the constitutively open channel¹⁹ referring them as important actors involved in astrocytic Ca^{2+} entry.

Interestingly, within the CA1 region of mouse hippocampus, functional TRPA1 were only detected in astrocytes¹⁰. Based on immunohistochemistry of fixed brain sections, we found that TRPA1 channels staining appeared as discrete punctates predominantly co-localized with astrocytes (GFAP-positive cells; Supplementary Fig. 3). Higher-resolution images showed that TRPA1 channels were expressed in both cell body and thick processes of *stratum radiatum* astrocytes objectivized by the GFAP co-staining. TRPA1 channels were also expressed in thin processes continuous with GFAP-positive stem processes (Fig. 29a; Supplementary Movie 2).

In physiological condition, incubation of slices with the selective TRPA1 blocker, HC 030031 $(40 \ \mu\text{M})^{20}$, during 5 min had no effect on the proportion of spontaneous active astrocytes within the bulk loaded network (56.5 ± 3.5 % active astrocytes; n = 7 slices from 3 animals; p = 0.17; Fig. 29b) but increased the frequency of Ca²⁺ events (0.56 ± 0.03 event/min; n = 167 astrocytes; p = 0.043; Fig. 29c). In patch-clamped cell, incubating 5 min slices with 40 μ M HC 030031 had no impact on the proportion of active microdomains (62.8 ± 5.7 %; n = 7 astrocytes from 4 animals; p = 0.71; Fig. 29e) or on Ca²⁺ signal frequency (0.50 ± 0.01 event/min; n = 919 ROIs; p = 0.19; Fig. 29f). Together, these data confirmed that TRPA1 does not contribute to spontaneous Ca²⁺ signaling in the astrocytic arbor territory of *stratum radiatum* astrocytes^{11,17}.

Interestingly, when A β o was applied in presence of HC 030031 (40 µM), the astrocytic Ca²⁺ hyperactivity was totally abolished and restored to basal levels either in the astrocytic network or in the processes territory. In bulk loading condition, the proportion of active astrocytes decreased (57.1 ± 2.8 % in A β o + HC 030031 *vs* 69.7 ± 2.1 % in A β o condition; *n* = 10 slices from 3 animals; *p* = 0.0021; Fig. 29b) and was reversed to physiological condition level (49.1 ± 2.2 %; *p* = 0.08). Frequency also decreased when HC 030031 was co-applied with A β o (0.67 ± 0.04 event/min *vs* 0.83 ± 0.04 event/min in A β o condition; *n* = 181 astrocytes; *p* = 0.013; Fig. 29c) but remained higher than in physiological condition (0.49 ± 0.01 event/min; *p* = 0.0002). Frequency distribution tended toward physiological distribution and the proportion of hyperactive astrocytes was reduced (23 % in A β o + HC 030031 *vs* 75.8 ± 2.5 % in A β o condition; *n* = 5 astrocytes from 4 animals; *p* = 0.03) close to physiological value (57.9 ± 4.8 %; *p* = 0.87; Fig. 29e) together with the events frequency (0.47 ± 0.09 event/min in A β o + HC

030031 *vs* 0.54 ± 0.07 event/min in Aβo condition; n = 760 ROIs; p < 0.0001; Fig. 29f). The ratio of expanded/focal event decreased (30 % of expanded event in Aβo + HC 030031 *vs* 41 % in Aβo condition; p = 0.039; Supplementary Fig. 4) reaching physiological value (33 %; p = 0.45). Expanded surface extension also shrank (7.2 ± 0.5 µm² *vs* 9.2 ± 0.5 µm²; p = 0.017; Supplementary Fig. 4) close to physiological size (7.1 ± 0.4 µm²).

Thus, while having a negligible impact on physiological spontaneous Ca^{2+} activity, blocking TRPA1 channels cancelled astrocyte Ca^{2+} hyperactivity induced by A β o leading most of the spatiotemporal Ca^{2+} signal properties back to physiological state in either the astrocytic arbor microdomains or the cell body astrocytic network.



Figure 29 TRPA1 channels mediate astrocytic hyperactivity. (a) Immunohistochemistry of mouse *stratum radiatum* astrocytes showing that TRPA1 channels expression (green) was located in GFAP-positive processes (magenta) but also went over in distal processes excluding GFAP staining (e.g. white arrowheads). (b, c) Within the astrocytic network, proportion of astrocytes displaying calcium activity and frequency of astrocyte calcium activity in physiological condition (light grey; n = 43), under 100 nM A β o application (orange; n = 12), 40 μ M HC 030031 application (dark grey; n = 7) and 100 nM A β o + 40 μ M HC 030031 co-application (cyan; n = 10). (d) Frequency histogram revealing that A β o-induced hyperactivity is reduced when HC 030031 is co-applied (cyan). Related theoretical Poisson distributions were shown accordingly. (e, f) Within single astrocyte arbor, proportion of subregions displaying calcium activity and frequency of astrocyte arbor, proportion of subregions displaying calcium activity and frequency of astrocyte calcium (light grey; n = 7), under 100 nM A β o application (orange; n = 13), 40 μ M HC 030031 application (dark grey; n = 7) and 100 nM A β o application (cyan; n = 5). Results are compared with the physiological condition with *, p < 0.05; **, p < 0.01 and ***, p < 0.001 or the A β o condition with #, p < 0.05; ##, p < 0.01 and ###, p < 0.001.

APP/PS1-21 mice display early astrocytic hyperactivity that involves TRPA1 channels

APP/PS1-21 mice co-express the human KM/67/671NL mutation in the amyloid precursor protein (APPswe) and the human L166P-mutated presenilin 1 (PS1) under the control of Thy1 promotor. These transgenic mice display high transgene expression with $A\beta_{1-42}$ levels being significant at 1 month and plaques appearing at 6 weeks of age in the neocortex and at 4-5 months in the CA1 hippocampus²¹. As external application of A β 0 induced an immediate astrocytic hyperactivity in hippocampal healthy brain slices, we wonder about the effect of A β in APP/PS1-21 mice at the beginning of its secretion within the brain. Thy1 is known to be expressed from ~P14 in mouse CA1 hippocampus²² thus A β_{1-42} might be produced from this stage. However, while being present at this early stage²¹, A β were not yet aggregated in plaques in APP/PS1-21 mice at 1-month-old while A β plaques were present in the hippocampus at 6-month-old as testified with Thioflavin S labeling²³ (Fig. 30a). Likewise, astroglial marker such as GFAP showed a similar profile in WT *versus* APP/PS1-21 mice at 1-month-old confirming the lack of reactive astrogliosis in these early stages (Fig. 30b).

We then recorded astrocytic Ca^{2+} signals in these young APP/PS1-21 mice (from P17 to P28) and compared to their littermates (WT). In bulk loaded slices, the proportion of active astrocytes within stratum radiatum was similar in both condition (40.7 ± 5.6 % in APP/PS1-21 vs 46.1 \pm 5.6 % in WT; n = 5 and 7 slices respectively from 3 animals each; p = 0.63; Fig. 31a). The frequency of Ca²⁺ events was slightly higher in APP/PS1-21 cells (0.57 \pm 0.09 event/min in APP/PS1-21 vs 0.34 \pm 0.03 event/min in WT; n = 58 and 91 astrocytes respectively; p = 0.06) and the frequency distribution was switched to higher frequency in APP/PS1-21 vs WT mice (Fig. 31a, b). Yet, in APP/PS1-21 mice, a majority of active astrocytes displayed low frequency activity (77 % < 0.2 event/min) whereas a second population emerged and developed differently from the WT distribution ($\lambda = 4.18 vs 1.19$ in WT; Fig. 30d). In patch-clamp loaded astrocyte, the proportion of active microdomains increased in APP/PS1-21 mice (65.7 \pm 2.0 % vs 55.0 \pm 4.8 % in WT; n = 4 astrocytes from 4 animals for each; p = 0.052; Fig. 31c) together with the frequency of events within these microdomains $(0.45 \pm 0.02 \text{ event/min } vs \ 0.40 \pm 0.01 \text{ event/min in WT}; n = 255 \text{ and } 426 \text{ ROIs}$ respectively; p = 0.04). The proportion of expanded/focal events was slightly affected in APP/PS1-21 mice in favor of expanded event and the size of expanded events was similar $(6.8 \pm 0.3 \ \mu\text{m}^2 \text{ in WT } vs \ 6.7 \pm 0.3 \ \mu\text{m}^2 \text{ in APP/PS1-21}; \ p = 0.42; \text{ Supplementary Fig. 4}).$ Thus, in young APP/PS1-21 mice, the astrocytic network Ca²⁺ activity was faintly disrupted while the compartmentalized activity within the astrocytic arbor started to be affected from the beginning of $A\beta$ overproduction.

In these conditions, blocking TRPA1 channels with HC 030031 (40 μ M) in APP/PS1-21 mice had no significant effect on the astrocytic network activity (Fig. 31a). However, we strikingly observed a clear redistribution of Ca²⁺ events frequency and a decrease of the proportion of hyperactive cells that both looked alike the WT situation ($\lambda = 1.35$; Fig. 31b). In patch-clamp loaded astrocyte, HC 030031 induced a significant decrease of the proportion of active microdomains in APP/PS1-21 mice (29.3 ± 6.2 %; n = 7 from 4 animals; p = 0.01; Fig. 31c) together with a restrained effect on the frequency (0.43 ± 0.06 event/min; n = 1213 and 1577 ROIs respectively; p = 0.06). The proportion of expanded/focal events was also reduced with HC 030031 treatment (Supplementary Fig. 4). Overall, these observations in young APP/PS1-21 mice matched the above related effect of A β o application in healthy slices consistently with a TRPA1 channel involvement. Merely, they were more subtle and initially restrained to the astrocytic arbor.

We then investigated the expression of TRPA1 channels in the hippocampus of young APP/PS1-21 mice and their littermates (WT). We found that the protein level of TRPA1 channels was similar in P19 mice (n = 6 hippocampus from 3 animals for each; p = 0.9; Fig. 30c) and twice higher in P30 APP/PS1-21 than WT mice (n = 8 hippocampus from 4 animals for each; p = 0.02; Fig. 30c) suggesting an early upregulation of this channel from the onset of A β secretion.



Figure 30 Young APP/PS1-21 mice are devoid of amyloid deposits and reactive astrocyte whereas gradually overexpress TRPA1. (a) Thioflavin S staining for β -amyloid deposits (green) and NeuN immunostaining (magenta) in the hippocampus of 1-month-old (left) and 6-month-old (right) APP/PS1-21 mice showing the progression of the number of amyloid deposits (e.g. white arrow). (b) GFAP (cyan) and NeuN (magenta) immunostainings in the *stratum radiatum* of P30 WT (left) and APP/PS1-21 (right) mice. (c) Westernblot analysis of protein levels of TRPA1 channels in hippocampus extracts from P19 and P30 WT and APP/PS1-21 mice (3 different extracts of P30 WT and APP/PS1-21 mice are shown). Histogram showing quantification of TRPA1 channels expression normalized to protein loading levels (n = 6 hippocampus in each group at P19 and 8 hippocampus in each group at P30). Results are compared with the WT mice with *, p < 0.05; **, p < 0.01 and ***, p < 0.001.



Figure 31 Young APP/PS1-21 mice display an early astrocytic compartmentalized hyperactivity. (a) Within the astrocytic network, proportion of astrocytes displaying calcium activity and frequency of calcium activity in APP/PS1-21 mice (orange; n = 5) and their littermates (WT, grey; n = 7) in physiological condition or with 40 µM HC 030031 (cyan, n = 7). (b) Frequency histogram showing the occurrence of Ca²⁺ events in the astrocyte population of APP/PS1-21 (orange), WT (grey) and APP/PS1-21 mice treated with 40 µM HC 030031 (cyan). Related theoretical Poisson distributions were shown accordingly. Pie chart representing inactive, active and hyperactive astrocytes in WT and APP/PS1-21 mice treated or not with HC 030031. (c) Within single astrocyte arbor, proportion of subregions displaying calcium activity and frequency of calcium activity in APP/PS1-21 mice (orange; n = 4) and their littermates (WT, grey; n = 4) in physiological condition or with 40 µM HC 030031 (cyan, n = 7). Results are compared with the WT mice with *, p < 0.05; **, p < 0.01 and ***, p < 0.001 or the APP/PS1-21 mice with #, p < 0.05; ##, p < 0.01 and ###, p < 0.001.

Aβo-induced CA1 neurons hyperactivity is related to the astrocytic TRPA1 channels activation

Astrocytes are known to actively regulate synaptic activity and plasticity⁴. Given the time range of the Aβ-mediated impact on astrocyte excitability, we wonder about its consequences on basal synaptic activity. Thus, to explore the outcome of A^βo induced TRPA1-dependent astrocyte hyperexcitability on neighboring synapses, we recorded CA1 pyramidal neurons spontaneous excitatory post-synaptic currents (sEPSCs) performing whole-cell patch-clamp recordings on CA1 neurons cell bodies (Fig. 32a). The initial mean frequency of sEPSCs recorded from CA1 pyramidal neurons was 0.13 ± 0.03 Hz (n = 22 neurons from 17 animals) and was stable during a 30-min recording (Fig. 32b, c). The mean peak amplitude of sEPSCs recorded from CA1 pyramidal neurons was 31.1 ± 2.0 pA. Interestingly, application of 40 μ M HC 030031 alone had no effect on sEPSCs frequency (74 ± 22 % from 5 to 10 minutes; n = 5cells from 3 animals; p = 0.6; Fig. 32b, c) suggesting that TRPA1 channels were not involved in physiological sEPSCs modulation. Application of 100 nM A^{\u036}o in the extracellular medium induced a rapid, strong and persistent increase of sEPSCs frequency (Fig. 32b; n = 7 cells from 6 animals) with no effect on the sEPSCs amplitude. We confirmed that application of monomeric forms of A_{β1-42} (A_βm) had no effect on sEPSCs frequency during the 30-min recording (n = 5; p = 0.78; Supplementary Fig. 2d) settling that only oligometric forms of A β_1 . 42 were active. Interestingly, the strong and persistent increase of sEPSCs frequency induced by Aβo was time-concomitant with the setting up of astrocyte hyperexcitability (*i.e.* 5 to 10 minutes, 245 ± 38 %; p = 0.01; Fig. 32c) and was fully abolished by co-application of HC 030031 (40 μ M) with Abo (88 ± 8 % from 5 to 10 minutes; n = 5 cells from 5 animals; p =0.005; Fig. 32b, c). This suggests that TRPA1 channels-dependent astrocyte hyperactivity induced by ABo directly influenced CA1 neurons activity and its blockade was enough to counteract the neuronal hyperactivity, at least in the short and medium term.



Figure 32 A β o increases the frequency of spontaneous excitatory post-synaptic currents (sEPSCs) from CA1 pyramidal neurons in a TRPA1 channels dependent manner. (a) Representative traces of voltage-clamp recordings from CA1 pyramidal cells held at -65 mV in physiological condition (grey) and under A β o 100 nM application (orange). An example of a single EPSC with higher time resolution is shown in the inset. (b) Time course of sEPSCs frequency in physiological condition (light grey; n = 5), under application of 100 nM A β o (orange; n = 7), 40 µM HC 030031 (dark grey; n = 5) or co-application of 100 nM A β o + 40 µM HC 030031 (cyan; n = 4). (c) Histogram showing the sEPSCs frequency at a time matching the astrocyte calcium activity measurements (*i.e.* 5 to 10 min after drugs application). Results are compared with the physiological condition with *, p < 0.05; **, p < 0.01 and ***, p < 0.001 or the A β o condition with #, p < 0.05; ##, p < 0.01 and ###, p < 0.001.

Discussion

In this study, we investigated the contribution of astrocyte in early A β o toxicity by studying calcium signaling in different parts of the whole astrocyte territory. We found that astroglia is a frontline target of A β o exhibiting a global and local Ca²⁺ hyperactivity that involves TRPA1 channels. This TRPA1 channel-dependent astrocytic Ca²⁺ hyperactivity exerts regulatory influences on synaptic function and is linked to the glutamatergic synapse hyperactivity recorded in CA1 neurons. Concurrently to these acute A β o-induced effects, in APP/PS1-21 mice hippocampus, astrocytes elicit a similar pattern of calcium hyperactivity that is reversed when TRPA1 channels are blocked. Moreover, TRPA1 channel is gradually overexpressed at the onset of A β production in this AD transgenic mouse.

Intracellular Ca²⁺ transients are considered as the primary signal by which astrocytes interact with neighboring neurons and astrocytes. Ca^{2+} has been extensively studied within astrocyte cell body and thick branches. More recently, local Ca^{2+} dynamics in distal fine processes has been investigated emphasizing a highly compartmentalized signaling, interconnected with physiological transmission at neighboring synapses^{8,9}. Compartmentalization of astrocytic Ca²⁺ dynamics needs to be attentively considered in order to understand how astrocytes may contribute to brain information processing⁸. We thus chose to study both level of information (*i.e.* network signaling and local microdomain signaling) combining bulk loading and single cell astrocyte loading. Genetically encoded Ca²⁺ indicators (GECIs) have been recently used to study distal thin processes Ca^{2+} signals⁹. Alternatively, patch pipette loading gave access to the whole territory of a single astrocyte and, currently, Fluo-4 is far more sensitive than genetically encoded Ca^{2+} indicators (GECIs) thus track smaller signals⁸. Accordingly, we observed a similar and even better diffusion of Fluo-4 in a single astrocyte compared to SR101. We first characterized mouse CA1 stratum radiatum astrocyte physiological calcium activity and showed that this activity is fully autonomous, *i.e.* independent on neuronal activity, both at the astrocytic network level and at the microdomain level. This is in agreement with data obtained in mouse CA1 hippocampus^{16,17} but is dissimilar to astrocyte behavior in dentate gyrus where expanded Ca^{2+} events were partly dependent on neuronal activity⁸. Interestingly, external Ca^{2+} entry is the main source of Ca^{2+} within thin processes whereas it only partly contributes to somatic signaling. This Ca^{2+} source dichotomy between astrocyte soma and processes Ca^{2+} events has already been described in brain slices²⁴. This might be supported by the subcellular location of calcium stores that are concentrated in cell body and thick processes but are almost away from thin processes¹⁸.

A central element of the pathogenesis of AD is the progressive accumulation of A^βo species, ultimately resulting in the formation of plaques. Yet, small soluble AB oligomers are sufficient to induce several features of the AD phenotype¹. The paths by which A_βo leads to neurodegeneration are probably multifactorial but converge all to synaptic dysfunction. Astrocytes are an integral part of synaptic transmission and are therefore critical for the establishment and maintenance of neuronal health⁵. They contribute to the neuronal dysfunction being proinflammatory²⁵ but also play a protective role, e.g. through the release of gliotransmitters²⁶ or A β clearance^{27,28}. It is thus of major importance to distinguish beneficial from deleterious impact of ABo on astrocyte function. ABo has already been involved as a direct effector on astrocyte in primary culture²⁹, in hippocampal slices³⁰ or *in vivo*¹² but we showed here a peculiar rapid action on compartmentalized calcium activity, activating a membrane Ca^{2+} permeable channel. Indeed, ABo application triggers global astroglial network Ca²⁺ hyperactivity in CA1 hippocampus together with an intensification of the compartmentalized Ca²⁺ activity in the astrocytic processes and a spatial extension of the size of the expanded Ca^{2+} events within microdomains. These effects are specific of oligomeric forms of AB since application of the monomeric form in the same condition had no impact on the astrocytic calcium activity. We reported that ABo effect on astrocyte excitability is fully independent on neuronal activity since TTX application does not prevent the ABo effect neither on the network hyperactivity nor on the processes compartmentalized hyperactivity. Removal of external Ca^{2+} largely inhibits Aßo-induced astrocyte hyperactivity at the network level while it has no effect in physiological condition. Removal of external Ca^{2+} also inhibits the majority of the compartmentalized A β o-induced hyperactivity. Thus, transmembrane Ca^{2+} entry carries most of the A β o-induced hyperactivity. Remarkably, we showed that both global and compartmentalized hyperactivities are driven by TRPA1dependent Ca^{2+} entry since HC 030031, a specific TRPA1 channel inhibitor, strongly abolishes A β o-induced astrocyte hyperexcitability and totally restores Ca²⁺ events spatiotemporal properties back to a physiological level.

TRPA1 channel is a Ca^{2+} permeable non-selective cation channel known to be expressed in astrocytes in mouse hippocampus¹⁰ regulating spontaneous Ca^{2+} signals within astrocytes branches up to 20 %¹¹. Within mouse CA1 hippocampus, TRPA1 channels are only expressed in astrocytes¹⁰ but their involvement in physiological astrocytic Ca^{2+} signaling is highly controverted. It has been shown that TRPA1 channels contribute to maintain basal Ca^{2+} levels¹¹ but poorly take part in astrocytic Ca^{2+} signaling^{16,17}. Our data assume that TRPA1 channels are physiologically slightly involved in the astrocytic Ca^{2+} signaling but are quickly

and largely involved in case of A β o presence. The absence of an obvious involvement of these channels in astrocyte physiological Ca²⁺ signaling is disturbing since we evidenced a TRPA1 channels expression in thick and thin astrocytic processes. Thus, TRPA1 channels could only behave as an "aggression sensor". Indeed, TRPA1channel gating is particularly regulated by numerous electrophilic activators - such as reactive oxygen species, reactive nitrogen species or oxidized lipids - and also functions as a mechanosensor¹⁹. Hence, TRPA1 channels might be possibly a direct target for A β o or might be secondarily activated through an A β o-induced oxidative stress and/or through its mechanosensor properties if A β o binds to the astrocytic cholesterol-rich plasma membrane¹⁴.

Strikingly, in young APP/PS1-21 mice, we observed a similar pattern of astrocytic compartmentalized hyperactivity setting up from the beginning of A^β overproduction in the hippocampus (~3 weeks). Interestingly, TRPA1 channels blockade with HC 030031 abolished the astrocyte Ca²⁺ hyperactivity. However, these early repercussions in young APP/PS1-21 mice were restricted to the astrocytic processes microdomains with fewer impacts on the astrocytic network. This suggests a gradual impact of surrounding A β on astrocyte signaling, first increasing the compartmentalized Ca²⁺ events frequency and, to a lesser extent, the proportion of active territories within the astrocytic processes. However, these impacts on astrocytic processes go along with a noteworthy redistribution of Ca^{2+} events frequency within the astrocytic network. Overall, TRPA1 channel signaling seems to be at the frontline in mediating these ABo progressive effects in early AD stage. Data obtained in advanced AD transgenic model showed a network astrocyte hyperactivity in cortical area close to AB plaques and an involvement of metabotropic purinergic signaling in this astrocyte hyperactivity¹³. This suggests a differential evolution of astrocyte involvement in AD pathogenesis depending on the stage, the structure and the physiopathological state of the astrocyte. Likewise, it has been reported that the protein level of TRPA1 channel was increased in hippocampal astrocytes of APP/PS1 mice at 8 months where it mediated inflammation through astrocyte activation³¹. Here, we showed that TRPA1 channel expression is increased as soon as 1 month in a more aggressive transgenic mouse model (APP/PS1-21) suggesting an involvement in early processes of pathophysiology, as soon as the Aßo level increases well before the setting up of astrogliosis or inflammatory processes.

Numerous laboratory studies in the past decade have shown that A β oligomers impair synaptic function and synaptic structure³². However, how soluble A β o initiate effects on synaptic structure and function remains to be determined. Each astrocyte deploys many fine processes to contact up to 140,000 synapses in the CA1 region³³. As we highlighted an intense

and early effect of A β o on astrocyte Ca²⁺ activity within processes, we assessed the link with spontaneous neuronal activity. Soluble A β oligomeric form is known to enhance spontaneous neuronal excitability in the CA1^{34,35}. Consistently, we showed here that A β o induces a rapid and strong increase of spontaneous EPSCs frequency in CA1 neurons. Strikingly, blocking astrocytic TRPA1 channels totally prevents this A β o neuronal impact. Thus, A β o-induced astrocyte hyperactivity impacts neighboring neurons increasing spontaneous EPSCs frequency in a TRPA1-dependent manner. It has been shown that A β can increase astrocytic release of glutamate to the extrasynaptic space resulting in the activation of extrasynaptic NMDARs and the disruption of neuronal signaling^{36,37}. Besides, astrocytes can regulate synaptic and extrasynaptic neurotransmitter concentrations, such as glutamate, in a Ca²⁺ dependent manner e.g. through vesicular release, bidirectional transport or hemichannel opening³⁸. We will further decipher pathways implemented by the A β -induced TRPA1-mediated Ca²⁺ entry that consequently affect neuronal transmission.

It has been demonstrated that soluble A β o can affect astrocyte signaling properties in various ways in mouse hippocampal CA1 astrocyte^{30,39,40}. To some extent, TRPA1 channel involvement superimposed to these effects, directly affecting local synaptic function in a distinctive precocious manner. This actor might contribute to the complex cellular phase of AD recently incorporated in the pathophysiological holistic view of this disease¹⁴.

In summary, we have shown that astroglial network and processes Ca^{2+} signaling disturbance induced by A β o are mediated by TRPA1 channel-dependent Ca^{2+} signaling. This new highlighted mechanism is at work both with an external supply of A β o and at the onset of A β production in an AD transgenic mice model. This astrocytic pathway is promptly implemented and involved in the well-known and characteristic A β o-induced synaptic dysfunction. Blockade of astrocytic TRPA1 is sufficient to counteract A β o impact on spontaneous neuronal activity suggesting that astrocyte can be considered as a frontline target in A β o synaptic toxicity. So far, altered astrocyte activation was usually associated with late AD, *i.e.* when amyloid plaques already developed, and the involvement of astrocyte in the initial toxic effect of A β o was not yet evidenced. One of the major findings of our study is to suggest that astrocytes are involved far before astrogliosis and inflammatory processes. Thus, focusing on this astrocyte involvement, e.g. modulating TRPA1 channel activity, may represent novel targets to ameliorate early dysfunction in AD.

Article scientifique.

Methods

Slice preparation

All experiments were carried out in accordance with the European Community Council directives of November 24, 1986 (86/609/EEC) and with the French guidelines on the use of living animals in scientific investigations with the approval of the "Grenoble Institute of Neurosciences Ethical Committee". Coronal hippocampal slices (ranging from 300 to 350 µm thick) were prepared from Swiss mice (postnatal day 17-23; Janvier, Le Genest St Isle, France) or APP/PS1-21 transgenic mice²¹ (postnatal day 17-28) together with control littermates. Mice were killed by decerebration and decapitated. The brain was rapidly removed and cut in ice-cold cutting ACSF containing (in mM): 2.5 KCl, 7 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 11 D-glucose and 234 sucrose bubbled with 95 % O₂ and 5 % CO₂, with a vibratome VT1200S (Leica, Wetzlar, Germany). Slices containing the hippocampus were placed in ACSF containing (in mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.2 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 1.2 NaH₂PO₄ bubbled with 95 % O₂ and 5 % CO₂ and supplemented with 1 mM sodium pyruvate at room temperature for a recovery period.

Slices bulk loading with Fluo-4 AM.

Briefly, 350 μ m coronal slices were loaded with the calcium indicator dye Fluo-4 by immersion for 45 minutes at 35°C in a bath containing 5 μ M Fluo-4 AM (Life Technologies), 0.01 % Pluronic acid F-127 (Molecular Probes), 0.005% Cremophor EL (Sigma-Aldrich) and 0.05 % DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich) in ACSF. The loading chamber was continuously oxygenated with 95 % O₂ and 5 % CO₂. Slices were then transferred into dye-free ACSF for at least 45 min prior to experiments. Mainly live astrocyte took up the fluorescent dye with these conditions^{41,42}.

Single-astrocyte dye loading with Fluo-4

Coronal 300 μ m slices were transferred to a chamber allowing constant perfusion with ACSF at room temperature, bubbled with 95 % O₂ and 5 % CO₂ on the stage of an upright compound microscope (Eclipse E600 FN, Nikon, Paris, France) equipped with a water immersion 60x objective (NA 1.0) and an infrared-differential interference contrast optics with CCD camera (Optronis VX45, Kehl, Germany). Glass pipettes 8-11 M Ω (Harvard apparatus) were filled with intracellular solution containing (in mM): 105 K-gluconate, 30 KCl, 10 phosphocreatine, 10 HEPES, 4 ATP-Mg, 0.3 GTP-Tris, 0.2 Fluo-4 pentapotassium

salt (Life Technologies), adjusted to pH 7.2 with KOH. Signals were amplified by Axopatch 200B, sampled by a Digidata 1440A interface and recorded with pClamp8 software (Molecular Devices, Foster City, USA). Astrocytes were identified based on morphological, localization in the *stratum radiatum* and negative resting potential (between -70 and -80 mV). Input resistance was calculated by measuring current in response to a 10 mV pulse with 80 ms duration, near the end of the voltage command. Only passive astrocytes showing linear *I/V* relationship and low input resistance ($\approx 50 \text{ M}\Omega$) were kept for dye loading. After achieving whole-cell configuration, access resistance was constantly monitored, and astrocytes were excluded from this study when this parameter varied > 20 % throughout the experiment. To allow sufficient diffusion of the dye and avoid astrocyte dialysis, the time in whole-cell configuration was limited to less than 5 min. Then, the patch pipette was carefully withdrawn to allow the astrocyte to recover. In order to maximize the diffusion of the dye into the astrocytic processes, we waited at least 15 min before calcium imaging^{8,15}.

Calcium imaging

Bulk or single-astrocyte loaded slices were placed in a constantly perfused chamber on the stage of an upright compound microscope (Eclipse E600 FN, Nikon, Paris, France) equipped with a water immersion 40x (NA 0.8) or 60x (NA 1.0) objective and a confocal head (confocal C1 head, Nikon, Paris, France). Excitation was achieved with light at 488 nm and emission was filtered with a 515 \pm 15 nm filter. Images were acquired with EZ-C1 software (Nikon, Paris, France) at 1.2 s intervals in a single confocal plane over a period of 5 min.

Bulk loading calcium imaging data analysis

Prior to analysis, raw images were stabilized (when needed if slight *x-y* drift occurred during recordings, z drifts were excluded) using ImageJ plugin Template Matching. *CalSignal* software was used to measured intracellular Ca²⁺ activity, analyzing the fluorescence signal F within each region of interest (ROI) corresponding to the cell body area of each astrocyte⁴³. F₀ was calculated for each ROI on the recording period. Based on the Δ F/F₀ ratios, significant fluorescence variations were detected and a Ca²⁺ event was defined as a significant and continuous signal increase larger than a fixed threshold followed by a significant and continuous signal decrease larger than the same threshold. Thus, cells were defined as active when fluorescence increased ≥ 2 standard deviations relative to baseline fluorescence. After peak detection, each Ca²⁺ transients were visually checked by the operator. The theoretical

Poisson distribution was calculated by the method of least squares approximating λ until it most closely fits the observed frequency distribution.

Single astrocyte loading data analysis

Ca²⁺ transients were measured in two-dimensional images, in individual subregions matching the shape of the astrocyte structure. Manually selected ROIs (~1 μ m²) were placed along astrocytic processes lying in the focal plane⁸ and a ROI was also selected in the soma if accessible. Prior to analysis, raw images were stabilized (when needed if slight *x-y* drift occurred during recordings, z drifts were excluded) using ImageJ plugins Template Matching and filtered with 3D Hybrid Median Filter⁷. *CalSignal* software was used to measure intracellular Ca²⁺ activity, analyzing the fluorescence signal F within each ROI. As described above, significant changes in fluorescence were detected on the basis of the calculated Δ F/F₀ ratios. Each Ca²⁺ transients within ROI were visually checked by the operator and reported in a raster plot in order to discriminate focal activities from expanded ones (as described by⁸). At the end of each recording, z-stacks (0.5 μ m steps) were performed to obtain tri-dimensional projections of astrocyte territories revealed by Fluo-4 loading. Images were then filtered with 3D Hybrid Median Filter plugin in ImageJ.

Electrophysiological recordings

Whole-cell recordings were made from the somata of visually identified CA1 pyramidal neurons. Patch pipettes (4-6 M Ω) were filled with an internal solution containing (in mM): 105 K-gluconate, 30 KCl, 10 phosphocreatine, 10 HEPES, 4 ATP-Mg, 0.3 GTP-Tris, 0.3 EGTA, adjusted to pH 7.2 with KOH. Spontaneous excitatory post-synaptic currents (sEPSCs) were collected at a membrane holding potential of -65 mV which is close to the reverse potential of GABA. All recordings were done at room temperature (22-24°C) and only a single neuron was studied per slice. sEPSCs and their kinetics were analyzed in 5-min epochs within the time frame of the recordings. Each epoch was compared to the initial 5-min recording and sEPSCs frequencies were normalized to this initial value. Access resistance was constantly monitored and recordings were excluded from this study when this parameter varied > 20 % throughout the experiment. Recordings were analyzed using the Clampfit module of the pClamp8 software (Molecular Devices, Foster City, USA) with a threshold at -20 pA to exclude miniature EPSCs.

$A\beta$ oligomerization, monomer purification and drug application

Recombinant $A\beta_{1.42}$ peptide (Bachem) was resuspended in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) to 1 mM until complete resuspension as described previously⁴⁴. Following HFIP evaporation, A β oligomers were prepared by diluting A β to 1 mM in DMSO, then to 100 μ M in ice-cold ACSF with immediate vortexing and bath sonication, and then incubated at 4°C for 24 h with mild agitation.

When appropriate, the A β monomer is purified on a C18 column (SPE-Chromabond-HRX C18 ec, 200 µl, 5 mg, Macherey-Nagel, France). The column was equilibrated with 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA) in water. After loading the A β sample, the column is washed three times with 0.1 % TFA. Then, a gradient of acetonitrile from 30 to 60 % is applied (Supplementary Figure 2). Fractions (0.1 ml) were collected. The elution profile is determined by measuring the absorbance at 275 nm. The peak fraction was collected and the concentration of peptide was determined by absorbance at 275 nm using $\epsilon_{275 nm}$ = 1400 M⁻¹ cm⁻¹. The peptide is then stored at -80°C.

A β o, A β m, tetrodotoxin (TTX; Latoxan, Valence, France), Ca²⁺-free solution (ACSF - 0 Ca²⁺ - 1 mM EGTA) and HC 030031 (Sigma-Aldrich) were bath applied at the appropriate concentration during 5 min before and during calcium imaging or electrophysiological recordings.

Immunohistochemistry

Mice were deeply anesthetized with 10 % chloral hydrate and perfused intracardially with 10 ml 0.9 % NaCl followed by 35 ml 4 % paraformaldehyde in 0.1 M PBS, pH 7.3. Brains were rapidly removed, post-fixed overnight at 4°C in 4 % paraformaldehyde, immersed in 20 % sucrose in 0.1 M PBS, pH 7.5 overnight, frozen in cooled (-35°C) isopentane and stored at - 30°C. Serial frontal sections (30 µm thick) were cut with a cryostat microtome (HM 500 M, Microm, Francheville, France). Sections were blocked by incubation with 3% bovine serum albumin in TBS-Tween-Triton (TBSTT) (0.1 M Tris Base, 0.15 M NaCl, 0.1 % Tween, 0.1 % Triton X-100) for 30 minutes (dilution/blocking buffer). Tissue sections were then incubated overnight at 4°C with either an anti-NeuN antibody (AbCys, France, mouse monoclonal; 1:500), anti-GFAP antibody (Molecular Probes, USA, mouse monoclonal; 1:1000) and anti TBSTT and incubated for 2 h at room temperature with Cyanin 3- (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA; 1:1000) or Alexa 488-conjugated secondary antibodies (Life

Article scientifique.

Tecchnology, USA; 1:1000). Sections were washed in TBSTT and mounted in Dako fluorescent mounting medium (Dako, USA).

When appropriate, amyloid- β deposits were stained using Thioflavine S²³. Sections were rehydrated in TBS buffer (0.1 M Tris Base, 0.15 M NaCl), incubated in filtered 1 % aqueous Thioflavine S (Sigma, France) for 8 minutes at room temperature, in the dark and washed several times in TBS buffer.

Image acquisition

Sections were examined with a Zeiss LSM 710 confocal laser scanning microscope with a Plan Apochromat 20x objective (NA 0.8) or an oil immersion Plan Neofluor 40x objective (NA 1.3) and translating platform with motorized crossed roller stages. When appropriate, mosaics were acquired for each channel separately with "Zen" software, in a 12-bit format, using the tile scan function. For TRPA1 and GFAP co-staining, sections were also acquired with a Zeiss Airyscan module with an oil immersion Plan Apochromat 63x objective (NA 1.46) to improve lateral resolution (~140 nm) and signal-to-noise ratios. For illustration, images were merged with ImageJ software.

Immunoblotting

Dissected hippocampi from 1-month old APP/PS1-21 mice were homogenized in cold buffer containing 0.32 M sucrose and 10 mM HEPES, pH 7.4. Samples were maintained at 4°C during all steps of the experiments. Homogenates were cleared at 1000 x g for 10 min to remove nuclei and large debris. Samples in loading buffer were boiled for 10 min and equal amounts of proteins (20 µg, quantified by micro-BCA assay (Pierce) in duplicate extracts) were resolved on a 4-20 % gradient Bis-Tris polyacrylamide precast stain free gels (Bio-Rad) in denaturing conditions. Proteins were transferred to a poly vinylidenedifluoride membrane (Millipore) for 30 min at 4°C. Membranes were blocked with 3 % dry milk in Tris-Buffered Saline (TBS: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4) containing 0.1 % Tween for 1 hour at room temperature. Membranes were probed with anti-TRPA1 antibody (Novus, USA; 1:2000) diluted in 3 % dry milk in 0.01 % Tween TBS overnight at 4°C. Membranes were washed in 0.2 % Tween TBS and probed with HRP-conjugated anti-rabbit IgG (Fab') (Interchim, France; 1:40000) antibody for 45 min at room temperature. After washes, specific proteins were visualized with an enhanced chemiluminescence ECL Detection System (Bio-Rad) and the chemidoc system (Bio-Rad). Chemiluminescence signals were normalized to protein loading signals acquired using Stain-free pre-cast gels (Bio-Rad).

Statistical analysis

Data were analyzed using R (the R Project for Statistical Computing)⁴⁶. Comparisons between two groups were conducted with the two-tailed Mann-Whitney test. Kruskal-Wallis test followed by Pairwise comparison using Wilcoxon rank sum test was used when needed for multiple comparisons. Proportions of astrocyte activity and between focal/expanded activities were compared with χ^2 -test. Data were expressed as mean \pm SEM accompanied by distribution of experimental points. Graphic significance levels were *, p < 0.05; **, p < 0.01and ***, p < 0.001.

Article scientifique.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Fabien Mehr and Flore Rimet for their technical assistance in animal perfusion, Yasmina Saoudi for her technical assistance in Airyscan image acquisition on PIC-GIN platform of Grenoble Institut des Neurosciences, Dr Jean-Claude Platel and Dr Elodie Fino for stimulating scientific discussions.

Author contributions

A.B.¹ performed the calcium imaging experiments. A.P. carried out the electrophysiological experiments and contributed to some calcium imaging experiments. S.B. performed the immunoblotting and immunohistochemistry experiments. M.J-S carried out purification of A β monomeric forms. A.B.¹, A.B.² and M.A. designed the experiments. A.B.¹, A.P., S.B and M.A. analyzed the data. A.B¹ and M.A. wrote the manuscript. All authors discussed the results and commented on the manuscript at all stages. (A.B.¹, Anthony Bosson; A.B.², Alain Buisson).

Supplementary figures



Figure 33 Supplementary Figure 1: Characterization of Fluo-4-loaded cells in the *stratum radiatum* **of mouse coronal slice.** (a) Confocal image of Fluo-4-loaded (cyan) and SR101-labeled (magenta) cells in the CA1 *stratum radiatum.* Merged image showing the proportion of loaded astrocytes (white), confirming that most of the loaded cells are astrocytes. One hour before slicing, animals were iv injected with SR101 as described previously⁴⁷. Vessels are only labeled with SR101 (white arrow). (b) *Z*-stack projections of confocal images of a patched astrocyte loaded with Fluo-4 (cyan) and SR101 (magenta). Merged image showing the Fluo-4 diffusion in the whole astrocytic territory. (c) Example of a passive whole-cell current recorded in a *stratum radiatum* astrocyte. Cell was held at -70 mV and 10 mV hyper- and depolarizing voltage steps of 80 ms duration were applied (-110 to +80 mV).



Figure 34 Supplementary Figure 2: Characterization and effects of A β oligomers and purified monomers. (a) SDS-PAGE analysis of A β oligomers examined by western-blot with 4G8 antibody. A β o showed faintly monomers and abundant dimers and trimers. (b) SDS-PAGE analysis of A β monomers after purification on C18 column. All fractions were electrophoresed on 15 % tris-glycine gel. A β monomer is mainly eluted at 30 % acetonitrile. S, sample loaded; FT, flow through; peptides eluted at 30, 40, 50 and 60 % acetonitrile. (c) Within the astrocytic network, proportion of astrocytes displaying calcium activity and frequency of astrocyte calcium activity in physiological condition (grey; *n* = 43), under 100 nM A β o application (dark orange; *n* = 12) and under 100 nM A β m application (light orange; *n* = 7). (c) Time course and histogram at 5-10 min of sEPSCs frequency in physiological condition (light grey; *n* = 5), under application of 100 nM A β o (orange; *n* = 7) or 100 nM A β m (light orange; *n* = 5). In any case, A β m was obtained from the 30 % acetonitrile fraction purified in b.



Figure 35 Supplementary Figure 3: TRPA1 is preferentially expressed in *stratum radiatum* astrocytes. (a) Immunohistochemistry of mouse *stratum radiatum* astrocytes showing that TRPA1 channels (green) are expressed within astrocytic domains certified by GFAP staining (magenta). White arrowheads showed an example of TRPA staining along an astrocyte process. Merged image showing that most TRPA1 staining co-localized and surrounded GFAP-positive processes.



Figure 36 Supplementary Figure 4: Spatial properties of compartmentalized calcium events in the astrocytic processes. (a) Proportion of expanded/focal events in physiological condition, under 100 nM A β o application, 100 nM A β o + 500 nM TTX co-application, 100 nM A β o in Ca²⁺-free medium and 100 nM A β o + 40 μ M HC 030031 co-application. (b) Proportion of expanded/focal events in APP/PS1-21 mice and their littermates (WT) in physiological condition or under 40 μ M HC 030031 treatment. (c) Mean size of expanded Ca²⁺ events in physiological condition (grey), under 100 nM A β o application (orange), 100 nM A β o + 500 nM TTX co-application (dark blue),100 nM A β o in Ca²⁺-free medium application (0 Ca; light blue) and 100 nM A β o + 40 μ M HC 030031 co-application (cyan). (d) Mean size of expanded Ca²⁺ events in APP/PS1-21 mice (orange) and their littermates (WT, grey) in physiological condition or with 40 μ M HC 030031 treatment (WT, dark grey and APP/PS1-21, cyan). Results are compared with the physiological condition with *, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01 and ***, *p* < 0.001 or the A β o condition with #, *p* < 0.05; ##, *p* < 0.01 and ###, *p* < 0.001.

References

1. Haass, C. & Selkoe, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8, 101–12 (2007).

Verkhratsky, A. & Steinhauser, C. Ion channels in glial cells. Brain Res Brain Res Rev 32, 380–412 (2000).

3. Panatier, A. et al. Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. Cell 125, 775–784 (2006).

4. Haydon, P. G. GLIA: listening and talking to the synapse. Nat Rev Neurosci 2, 185–193 (2001).

5. Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P. & Haydon, P. G. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. Trends Neurosci. 22, 208–15 (1999).

6. Verkhratsky, A., Reyes, R. C. & Parpura, V. TRP channels coordinate ion signalling in astroglia. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 166, 1–22 (2014).

7. Haustein, M. D. et al. Conditions and constraints for astrocyte calcium signaling in the hippocampal mossy fiber pathway. Neuron 82, 413–29 (2014).

8. Di Castro, M. A. et al. Local Ca2+ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. Nat. Neurosci. 14, 1276–84 (2011).

9. Shigetomi, E. et al. Imaging calcium microdomains within entire astrocyte territories and endfeet with GCaMPs expressed using adeno-associated viruses. J. Gen. Physiol. 141, 633–47 (2013).

10. Shigetomi, E., Tong, X., Kwan, K. Y., Corey, D. P. & Khakh, B. S. TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. Nat. Neurosci. 15, 70–80 (2012).

11. Shigetomi, E., Jackson-Weaver, O., Huckstepp, R. T., O'Dell, T. J. & Khakh, B. S. TRPA1 channels are regulators of astrocyte basal calcium levels and long-term potentiation via constitutive D-serine release. J. Neurosci. 33, 10143–53 (2013).

12. Kuchibhotla, K. V, Lattarulo, C. R., Hyman, B. T. & Bacskai, B. J. Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice. Science (80-.). 323, 1211–1215 (2009).

13. Delekate, A. et al. Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. Nat. Commun. 5, 5422 (2014).

14. De Strooper, B. & Karran, E. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. Cell 164, 603–615 (2016).

15. Nett, W. J., Oloff, S. H. & McCarthy, K. D. Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. J. Neurophysiol. 87, 528–37 (2002).

 Nakayama, R., Sasaki, T., Tanaka, K. F. & Ikegaya, Y. Subcellular calcium dynamics during juvenile development in mouse hippocampal astrocytes. Eur J Neurosci 43, 923–932 (2016).

17. Rungta, R. L. et al. Ca(2+) transients in astrocyte fine processes occur via Ca(2+) influx in the adult mouse hippocampus. Glia (2016). doi:10.1002/glia.23042

18. Patrushev, I., Gavrilov, N., Turlapov, V. & Semyanov, A. Subcellular location of astrocytic calcium stores favors extrasynaptic neuron-astrocyte communication. Cell Calcium 54, 343–9 (2013).

19. Nilius, B., Appendino, G. & Owsianik, G. The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 464, 425–58 (2012).

20. McNamara, C. R. et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. Proc. Natl. Acad. Sci.U. S. A. 104, 13525–30 (2007).

21. Radde, R. et al. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. EMBO Rep. 7, 940–6 (2006).

22. Porrero, C., Rubio-Garrido, P., Avendaño, C. & Clascá, F. Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice. Brain Res. 1345, 59–72 (2010).

23. Apelt, J. & Schliebs, R. Beta-amyloid-induced glial expression of both pro- and antiinflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology. Brain Res. 894, 21–30 (2001).

24. Srinivasan, R. et al. Ca2+ signaling in astrocytes from Ip3r2–/– mice in brain slices and during startle responses in vivo. Nat. Neurosci. 18, 708–17 (2015).

25. Orre, M. et al. Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. Neurobiol. Aging 35, 2746–2760 (2014).

26. Jung, E. S., An, K., Hong, H. S., Kim, J.-H. & Mook-Jung, I. Astrocyte-originated ATP protects $A\beta(1-42)$ -induced impairment of synaptic plasticity. J. Neurosci. 32, 3081–7 (2012).

27. Kraft, A. W. et al. Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. FASEB J. 27, 187–98 (2013).

28. Wyss-Coray, T. et al. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. Nat. Med. 9, 453–7 (2003).

135

29. Grolla, A. A. et al. Amyloid-beta and Alzheimer's disease type pathology differentially affects the calcium signalling toolkit in astrocytes from different brain regions. Cell Death Dis 4, e623 (2013).

30. Pirttimaki, T. M. et al. α 7 Nicotinic receptor-mediated astrocytic gliotransmitter release: A β effects in a preclinical Alzheimer's mouse model. PLoS One 8, e81828 (2013).

31. Lee, K.-I. et al. Role of transient receptor potential ankyrin 1 channels in Alzheimer's disease. J. Neuroinflammation 13, 92 (2016).

32. Mucke, L. & Selkoe, D. J. Neurotoxicity of amyloid β-protein: synaptic and network dysfunction. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2, a006338 (2012).

33. Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z. & Ellisman, M. H. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. J. Neurosci. 22, 183–92 (2002).

34. Varga, E. et al. Abeta(1-42) enhances neuronal excitability in the CA1 via NR2B subunit-containing NMDA receptors. Neural Plast. 2014, 584314 (2014).

35. Lei, M. et al. Soluble A β oligomers impair hippocampal LTP by disrupting glutamatergic/GABAergic balance. Neurobiol. Dis. 85, 111–121 (2016).

36. Talantova, M. et al. A β induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, E2518-27 (2013).

37. Kervern, M. et al. Selective impairment of some forms of synaptic plasticity by oligomeric amyloid-beta peptide in the mouse hippocampus: implication of extrasynaptic NMDA receptors. J Alzheimers Dis 32, 183–196 (2012).

38. Malarkey, E. B. & Parpura, V. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. Neurochem Int 52, 142–154 (2008).

39. Scimemi, A. et al. Amyloid- β 1-42 slows clearance of synaptically released glutamate by mislocalizing astrocytic GLT-1. J. Neurosci. 33, 5312–8 (2013).

40. Yi, C. et al. Astroglial connexin43 contributes to neuronal suffering in a mouse model of Alzheimer's disease. Cell Death Differ. 7, 1–11 (2016).

41. Barat, E. et al. Subthalamic nucleus electrical stimulation modulates calcium activity of nigral astrocytes. PLoS One 7, e41793 (2012).

42. Reeves, A. M., Shigetomi, E. & Khakh, B. S. Bulk loading of calcium indicator dyes to study astrocyte physiology: key limitations and improvements using morphological maps. J Neurosci 31, 9353–9358 (2011).

43. Platel, J.-C. C. et al. Synchrony of spontaneous calcium activity in mouse neocortex before synaptogenesis. Eur J Neurosci 25, 920–928 (2007).

44. Stine, W. B., Dahlgren, K. N., Krafft, G. A. & LaDu, M. J. In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. J. Biol. Chem. 278, 11612–22 (2003).

45. Girod, S. et al. Specific in vivo staining of astrocytes in the whole brain after intravenous injection of sulforhodamine dyes. PLoS One 7, e35169 (2012).

46. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing.R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (2008). ISBN 3-900051-07-0 http://www.R-project.org.

5.2. Points clés de l'article.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence des modifications très précoces des différents acteurs de la synapse tripartite en présence d'Aβo.

- 100 nM d'Aβo induisent dès 5 minutes d'application une hyperactivité calcique du réseau astrocytaire et des microdomaines des prolongements. Cette hyperactivité se met également en place dès 3 semaines chez la souris APP/PS1-21.
- L'hyperactivité calcique induite par Aβo est dépendante de TRPA1.
- 100 nM d'Aβo induisent dès 5 minutes d'application une augmentation de la transmission glutamatergique basale.
- L'inhibition pharmacologique de TRPA1 permet de réverser l'hyperactivité calcique astrocytaire et l'hyperactivité neuronale.

Les astrocytes semblent donc constituer une cible de premier ordre lors des phases précoces de la maladie d'Alzheimer, la régulation de l'activité calcique astrocytaire pourrait ainsi permettre de contrecarrer les perturbations de l'activité synaptique induites par Aßo.

6. Discussion et perspectives

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative associée à une perte progressive de la mémoire et des fonctions cognitives. Ces symptômes seraient la conséquence d'une perte excessive des synapses, induite par l'accumulation au niveau cérébral du peptide amyloïde β puis des formes anormalement phosphorylées de la protéine Tau. L'hypothèse d'une séquence d'évènements, regroupée sous le terme de « cascade amyloïde » (Selkoe and Hardy, 2016), a permis de décrypter des modifications et des altérations affectants principalement les neurones. Durant les deux dernières décennies, plus d'une centaine d'essais cliniques ont découlé de cette hypothèse, mais ils n'ont malheureusement pas permis d'obtenir d'améliorations significatives dans le traitement de la maladie.

Ainsi, si l'hypothèse neuronale ne permet pas de comprendre pleinement l'évolution et les rouages de cette pathologie complexe, l'étude de nouveaux acteurs en relation avec les neurones permettra peut-être d'aller plus loin dans la compréhension de la maladie d'Alzheimer. L'implication des astrocytes dans le fonctionnement de la synapse tripartite pourrait être l'un de ces rouages manquants. Cependant, très peu d'études se sont intéressées au rôle des astrocytes et de leurs interactions avec les neurones dans la maladie d'Alzheimer. Toutefois, des premières études ont permis d'affirmer que les astrocytes sont impactés dans cette pathologie, notamment grâce à l'observation sur culture cellulaire, ou *in vivo* à proximité des plaques amyloïdes, de l'apparition de l'astrogliose et de perturbations de l'homéostasie calcique astrocytaire (Verkhratsky et al. 2016). Ces différentes études, sont souvent réalisées dans des environnements simplifiés qui ne prennent pas en compte les différentes éléments cellulaires du SNC ou à des stades tardifs de la maladie, quand les dommages cellulaires sont déjà très importants et irréversibles.

Un courant de pensée récent, propose d'étudier les modifications des différents partenaires synaptiques, lors des phases très précoces de la maladie qui précèdent la mort neuronale et l'apparition des symptômes irréversibles (De Strooper and Karran, 2016). En accord avec les premières études sur les astrocytes, cette hypothèse prédit une implication astrocytaire très précoce.

C'est dans ce contexte de modification précoce de la synapse tripartite lors de la maladie d'Alzheimer que se sont inscrits ces travaux de thèse.

6.1. Impact d'A $\beta_{1.42}$ sur l'activité calcique astrocytaire.

Dans ce projet, nous avons caractérisé l'impact des formes oligomériques solubles du peptide $A\beta_{1-42}$ ($A\beta_0$) sur l'activité calcique astrocytaire. Nous avons utilisé des concentrations faibles d' $A\beta_0$ qui miment le début de la surproduction d' $A\beta_{1-42}$ pour étudier l'activité calcique astrocytaire sur un modèle de tranches aigues d'hippocampe de souris. L'utilisation de tranches aigues permet de conserver des connexions physiques et fonctionnelles entre les différents partenaires de la synapse tripartite. Nous avons couplé, à la méthode classique d'étude de l'activité calcique astrocytaire somatique, une méthode permettant d'avoir accès aux activités compartimentées de l'arborisation astrocytaire (Di Castro et al., 2011; Nett et al., 2002; Panatier et al., 2011). Ainsi, la combinaison de ces deux stratégies nous a permis de rendre compte à la fois de l'activité calcique du réseau astrocytaire (*via* les activités somatiques) et de l'activité des prolongements astrocytaires. A ma connaissance, les effets d'A β o sur ces activités n'avaient jamais été étudiés.

D'un point de vue physiologique, nous avons observé que l'activité calcique somatique astrocytaire spontanée au niveau du stratum radiatum de l'hippocampe est indépendante, à la fois de l'activité neuronale et du calcium extracellulaire. Au niveau des prolongements, l'activité calcique des microdomaines est également indépendante de l'activité neuronale. Cette interaction avec l'activité neuronale semble dépendre de la région d'étude, puisqu'au niveau du gyrus denté, l'activité calcique au sein des microdomaines est fortement réduite en présence de TTX (Di Castro et al., 2011). En revanche, nous avons observé, comme d'autres groupes (Nakayama et al., 2016; Rungta et al., 2016a), que l'activité au sein des microdomaines est fortement régulée par les entrées de calcium externe. La déplétion du calcium extracellulaire inhibe environ 90 % de l'activité calcique dans les microdomaines. Ceci suggère donc une utilisation différente des sources de calcium, entre le corps cellulaire et les prolongements astrocytaires. Il a d'ailleurs été mis en évidence par microscopie électronique, une absence de réticulum endoplasmique au niveau des prolongements périsynaptiques astrocytaires (Patrushev et al., 2013). On peut alors imaginer que les entrées de calcium externe soient principalement dépendantes de canaux présents au niveau de la membrane des prolongements. Ceci pourrait permettre aux astrocytes une intégration plus rapide des modifications de l'environnement synaptique et des différents stress, sans nécessiter de relais par les stocks internes. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que l'activité calcique somatique et des prolongements astrocytaires soit modifiée en présence d'Aßo.

Des études ont observé une hyperactivité calcique somatique des astrocytes réactifs corticaux, dans les stades tardifs de la maladie, à proximité de plaques amyloïdes (Delekate et al., 2014; Kuchibhotla et al., 2009). Cependant aucune étude n'a regardé/analysé si cette hyperactivité calcique astrocytaire est présente précocement. Nous avons mis en évidence une hyperactivité calcique astrocytaire globale, induite dès 5 minutes par l'application exogène de 100 nM d'Aßo. Cette hyperactivité se manifeste à la fois au niveau du réseau astrocytaire (augmentation significative de la proportion d'astrocytes actifs et de la fréquence de ces activités) et au niveau des prolongements astrocytaires (augmentation significative du nombre de microdomaines mis en jeu). Nous avons également observé des modifications plus profondes de l'activité calcique astrocytaire induite par Aβo. Au niveau des prolongements, la présence de 100 nM d'Aßo tend à favoriser l'apparition d'activités qui se propagent sur de plus longues distances au sein de l'arborisation. Cette observation semble traduire un fort impact du peptide amyloïde β sur l'homéostasie calcique astrocytaire. Nous avons donc démontré que de faibles concentrations d'oligomères solubles d'A β_{1-42} , peuvent induire un remodelage très rapide des activités calciques astrocytaires, jusqu'au niveau des prolongements, qui sont susceptibles de contacter directement les synapses. Nous avons, en parallèle, démontré que ce sont bien les formes oligomériques qui sont responsables de ces modifications, puisque l'application de formes monomériques n'induit aucun effet sur l'activité calcique astrocytaire. Pour aller plus loin, il aurait été intéressant d'identifier si des formes particulières (dimères, trimères, [...], dodécamères) favorisent cette hyperactivité. En 2006, il avait été démontré chez la souris Tg2576, que les déficits de mémorisation étaient spécifiquement causé par l'accumulation extracellulaire de dodécamères du peptide amyloïde β (Lesné et al., 2006).

Les astrocytes semblent être une cible directe d'A β o, puisqu'en présence de TTX, l'hyperactivité calcique persiste et les paramètres spatio-temporels de cette hyperactivité ne sont absolument pas affectés par l'inhibition des potentiels d'action neuronaux. La distribution de fréquences des activités calciques somatiques et la répartition des activités *focal* et *expanded* dans les microdomaines, lors des co-applications d'A β o et de TTX, se superposent parfaitement à la condition A β o seul. Ceci renforce l'hypothèse d'une action directe d'A β o sur les astrocytes.

En condition physiologique, nous n'avions pas observé d'impact du calcium extracellulaire au niveau somatique. A l'inverse, cette source de calcium externe s'est révélée fortement impliquée dans les activités calciques des microdomaines. De manière intéressante, la

déplétion du calcium extracellulaire en présence d'A β o a permis de bloquer l'hyperactivité induite par A β o, à la fois au niveau somatique et au niveau des microdomaines. Au niveau somatique, le profil de la distribution des fréquences tend également à un retour vers une distribution physiologique. Ceci suggère donc qu'A β o pilote et impose un nouvel état à l'activité calcique astrocytaire, en modifiant fortement son homéostasie.

Les modifications fonctionnelles de l'activité astrocytaire s'accompagnent souvent de modifications structurales (Tanaka et al., 2013) touchant notamment, le recouvrement synaptique par les prolongements astrocytaires qui est régulé de façon dynamique (Bernardinelli et al., 2014b; Ventura and Harris, 1999; Villalba and Smith, 2013). Nous avions précédemment montré que de telles modifications structurales étaient associées à des contextes pathologiques (Bosson et al., 2015). Dans la lignée de ces études, nous avons essayé de déterminer si la présence d'Aßo pouvait aboutir à un remodelage de l'arborisation astrocytaire. Pour cela, en fin de chacune des acquisitions en imagerie, une reconstruction en 3D du volume de l'astrocyte chargé par le Fluo-4 par la pipette de patch-clamp a été effectuée. Une analyse de Sholl en 3D a ensuite été appliquée aux reconstructions de ces astrocytes (Figure 37). Cette analyse consiste à appliquer des sphères concentriques centrées sur le soma de l'astrocyte et à compter le nombre d'intersections de chaque sphère avec un prolongement astrocytaire. Cette méthode permet d'obtenir une estimation de la ramification astrocytaire. Avec cette méthode nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de différences significatives entre les différentes conditions testées (c'est-à-dire avec ou sans application d'Aßo). Si des différences existent, nous nous sommes peut-être heurtés à la complexité de l'arborisation astrocytaire et à des problèmes liés à la résolution de nos images, qui ne sont pas adaptées à une étude de la régulation fine de l'arborisation astrocytaire. En effet, les prolongements périsynaptiques astrocytaires les plus distaux sont à l'échelle de la synapse (soit une centaine de nanomètres), ce qui se situe en dessous de la limite de résolution offerte par l'imagerie confocale classique. Nous avons également étudié cette réorganisation par des marquages immunohistochimiques dirigés contre la phosphoezrine qui est une protéine associée au cytosquelette spécifiquement exprimée dans les prolongements périsynaptiques (Bosson et al., 2015; Lavialle et al., 2011). Là encore, nous n'avons pu mettre en évidence de différence flagrante dans l'organisation de ces prolongements. L'utilisation de microscopie électronique afin de réaliser des coupes sériées de cerveaux permettant des reconstructions 3D à l'échelle du nanomètre, ou la mise en œuvre de techniques d'imagerie super résolutive tel que le STED (stimulated-emission-depletion), couplée à des marquages anticorps dirigés contre les protéines des compartiments pré et post-synaptiques (synaptophysine et PSD-95 respectivement) et des prolongements astrocytaire (phosphoezrine), seraient de bonnes alternatives pour étudier l'évolution de la morphologie astrocytaire avant l'apparition de l'astrogliose.



Figure 37 Analyse de Sholl en 3D à partir de projections en z d'astrocytes chargés avec le Fluo-4. (A) L'astrocyte chargé avec le Fluo-4 est transformé en squelette (B) en fonction des maximums d'intensité de fluorescence. (C) Projection de l'analyse de Sholl appliquée sur le squelette, les fausses couleurs représentent le nombre d'intersections de chaque sphère. Dans un souci de visualisation, l'analyse est représentée en 2 D sur cette figure.

Dans la suite de ce travail, nous avons ensuite cherché à identifier quel acteur moléculaire pourrait être impliqué dans les entrées de calcium et l'hyperactivité induites par l'Aβo.

6.2. TRPA1, cible d'A β o.

Récemment, il a été démontré que les activités calciques astrocytaires des microdomaines ne sont pas dépendantes des libérations de Ca²⁺ par le réticulum endoplasmique. En effet, l'émergence d'activités calciques dans les microdomaines n'est pas affectée dans un modèle de souris *Ip3r2^{-/-}* (Srinivasan et al., 2015). Ces activités compartimentées seraient, d'après nos observations et celles d'autres groupes (Nakayama et al., 2016; Rungta et al., 2016a), quasiment totalement dépendantes des entrées de calcium extracellulaire. Au niveau astrocytaire, les entrées de calcium peuvent mettre en jeu différents acteurs (voir **1.4.1.1**). Les récepteurs ionotropiques astrocytaires (AMPA, NMDA ou P2X) ont, à l'inverse des neurones, une faible perméabilité calcique (1 à 3 pS) représentant approximativement 4 % de la fraction des courants calciques astrocytaires (Verkhratsky et al., 2014). Le canal TRPA1 possède une forte conductance unitaire (110 pS) et une forte perméabilité au calcium (P_{Ca}/P_{monovalent} ≈ 5,9). Cette perméabilité peut augmenter davantage lors de l'activation du
Discussion et perspectives

canal (elle atteint environ 7,9) et représente alors approximativement 23 % de la fraction des courants calciques astrocytaires (Nilius and Owsianik, 2011). Ces caractéristiques font du canal TRPA1 un bon candidat pour participer aux entrées de calcium astrocytaire et notamment aux activités calciques des microdomaines.

Au niveau de l'hippocampe, l'expression de TRPA1 est décrite comme étant spécifiquement astrocytaire. De fortes preuves fonctionnelles de cette spécificité ont été récemment apportées (Shigetomi et al., 2012b, 2013a). Par marquages immunohistochimiques sur tranches d'hippocampes, nous avons identifié une expression du canal TRPA1 colocalisée avec le marquage GFAP astrocytaire, au niveau somatique, ainsi que dans les prolongements astrocytaires. Ce marquage est également présent dans les prolongements plus fins, n'exprimant pas la GFAP mais attenants aux prolongements proximaux.

Au niveau fonctionnel, nous avons mis en évidence que l'hyperactivité calcique induite par A β o est dépendante de ce canal TRPA1. Pour cela, nous avons utilisé un antagoniste spécifique (Mcnamara et al., 2007) de TRPA1 : HC 030031. D'autres antagonistes de TRPA1 ont été identifiés tels que le rouge de ruthénium, le camphre et l'A-967079, mais ne sont pas spécifiques ou, dans le cas de l'A-967079, ne bloque l'activation de TRPA1 que dans certaines conditions (pour revue voir Nilius et al. 2012). Nous avons choisi au regard de sa spécificité, d'utiliser l'HC 030031 pour inhiber TRPA1. Dans nos travaux, nous avons utilisé l'HC 030031 à une concentration de 40 μ M, en accord avec d'autres études portant sur l'implication de TRPA1 dans les activités calciques astrocytaires (Shigetomi et al., 2011, 2013a). Il aurait été intéressant de déterminer si de plus faibles concentrations auraient permis d'obtenir les mêmes effets, puisque l'IC₅₀ de l'HC 030031 se situe aux alentours de 6 μ M.

Le canal TRPA1 a été impliqué dans la régulation de la concentration basale de calcium astrocytaire au niveau du *stratum radiatum* de souris (Shigetomi et al. 2012b; Tong et al. 2013) mais peu dans la signalisation calcique astrocytaire basale (Nakayama et al., 2016; Rungta et al., 2016b). En condition physiologique, l'inhibition du canal TRPA1 ne semble ni perturber la genèse des activités calciques somatiques, ni celle des prolongements. Par contre, l'application de 40 μ M de l'antagoniste spécifique de TRPA1 (HC 030031) en présence d'A β o permet de bloquer totalement l'hyperactivité calcique induite par A β o. Cette inhibition de TRPA1 induit également un retour vers une distribution physiologique des fréquences des activités somatiques, couplé à une répartition des activités *focal* et *expanded* dans les microdomaines, similaires à ce qui est observé en condition physiologique. Ces résultats

suggèrent que l'hyperactivité calcique astrocytaire induite par Aβo est dépendante de l'activité de TRPA1 et que l'inhibition de ce canal est suffisante pour ramener à un état similaire à la condition physiologique, la signalisation calcique du réseau astrocytaire et des microdomaines.

Cette implication de TRPA1 dans l'effet d'Aßo pourrait provenir d'une interaction directe entre Aßo et TRPA1. Par enregistrements électrophysiologiques sur cultures neuronales, il a précédemment été décrit une interaction non compétitive d'Aβo et du récepteur α7nAchR, responsable de l'inhibition du récepteur (Bourin et al., 2003; Liu et al., 2001). Dans nos conditions, il serait intéressant à court terme, d'utiliser des techniques de coimmunoprécipitation afin d'envisager la possible interaction entre TRPA1 et Aßo. Une autre hypothèse pour expliquer l'activation de TRPA1 par Aßo passerait par une activation indirecte du canal. Il est établi que l'Aßo entraîne la production de ROS qui participent à la toxicité de la maladie d'Alzheimer (Tramutola et al., 2016). Par conséquent, il serait intéressant de déterminer le décours temporel de cette production de ROS par Aßo en utilisant des sondes fluorescentes pour détecter les ROS (Gomes et al., 2005). Le canal TRPA1 possède de nombreuses cystéines sur ses domaines intracellulaires qui peuvent être oxydées par les ROS, ce qui conduit à une activation du canal (Nilius et al., 2012). Il serait donc possible que la génération des ROS par Aßo induise l'activation de TRPA1. Etant donnée l'implication des astrocytes dans les mécanismes de défense face aux espèces réactives de l'oxygène, il serait également envisageable que l'activation de TRPA1 agissent comme un élément de détection du stress, qui pourrait stimuler, via une cascade de signalisation, la production de SOD1 et de glutathion pour limiter les dommages liés au ROS, à l'instar de l'induction de l'expression de la SOD1 suite à l'exposition au peroxyde d'hydrogène (Milani et al., 2011). Il est également possible que l'effet d'Aβo sur TRPA1 soit induit par un stress mécanique. Ce canal, au niveau de l'oreille interne (exprimé par les cellules ciliées), participe à la transformation du signal sonore en un signal électrique et chimique (Kwan et al., 2006; Nilius et al., 2012). La proximité d'Aßo avec la membrane plasmique pourrait, en conséquence, induire un stress mécanique responsable de l'activation de TRPA1.

L'implication de TRPA1 en réponse au peptide amyloïde β semble robuste. Cependant ce canal n'est pas la seule cible d'A β o au niveau astrocytaire. Différentes études ont mis en évidence un impact du peptide A β_{1-42} au niveau de récepteurs et transporteurs exprimés par les astrocytes. Les récepteurs α 7nAChR (Talantova et al., 2013) et mGluR5 (Lim et al., 2013; Shrivastava et al., 2013) sont activés par le peptide amyloïde, l'expression du transporteur

Discussion et perspectives

astrocytaire du glutamate GLT-1 diminue en présence du peptide amyloïde (Jacob et al., 2007). Ces différents effets participent à terme, à l'hyperactivité neuronale et astrocytaire observé dans la maladie d'Alzheimer. Un autre acteur majeur de la signalisation calcique astrocytaire qui pourrait potentiellement participer à cette hyperactivité pourrait être l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ NCX. Il a été montré que l'expression de cet échangeur est enrichie au niveau des prolongements astrocytaires (Minelli et al., 2007). De plus, comme décrit précédemment, en condition physiologique, le potentiel d'inversion des NCX est proche du potentiel membranaire de repos astrocytaire, permettant ainsi des entrées de calcium. NCX comme TRPA1, semble donc être un bon candidat impliqué dans la régulation des activités calciques dans les microdomaines. L'inhibition pharmacologique des NCX par le KB-R7943 (inhibiteur spécifique du mode inverse, (Amran et al., 2003)) devrait permettre de déterminer l'implication de cet échangeur dans les activités calciques des microdomaines. Nous pouvons imaginer que l'activation du NCX agisse de concert avec celle de TRPA1 mais également que ces deux acteurs soit impactés selon un décours temporel différent.

En effet, les entrées de calcium induites par A β o mettent probablement en jeu, dans le cas d'expositions prolongées, l'échangeur sodium calcium en mode normal, afin d'extruder le calcium vers le milieu extracellulaire (export d'un ion Ca²⁺ pour l'import de 3 Na⁺) pour préserver l'homéostasie calcique. L'étude de la signalisation sodique avec des sondes telles que le SBFI injectées à un astrocyte par la pipette de patch (Unichenko et al., 2012), couplée à des agents pharmacologiques, permettrai de mettre en évidence ce phénomène.

De manière intéressante, nous avons observé une fuite du Fluo-4 de l'astrocyte patché lorsque l'A β o était incubé plus de 10 minutes. Il est possible que cette perte de Fluo-4 soit due à une augmentation du couplage astrocytaire par les jonctions gaps, par exemple pour redistribuer le calcium en excès, suite à l'activation de TRPA1. Il est également envisageable que le Fluo-4 ait été extrudé vers le milieu extracellulaire par les hémicanaux, puisqu'une étude récente a mis en évidence une activation des hémicanaux (composés de Cx 43 et Panx1) induite par l'augmentation des concentrations de calcium intracellulaire astrocytaire chez la souris APP_{swe}/PS1_{dE9} (Yi et al., 2016).

Après avoir mis en évidence une hyperexcitabilité calcique astrocytaire généralisée dépendante de TRPA1 induite par des apports exogènes d'Aβo. Nous avons souhaité étudié l'activité calcique astrocytaire chez les souris APP/PS1-21 lors des phases précoces.

6.3. Hyperactivité calcique astrocytaire précoce chez la souris APP/PS1-21.

Les souris APP/PS1-21 co-expriment les mutations humaines APP_{swe} (KM/67/671NL) et PS1 (L166P-*mutated presenilin* 1) sous le contrôle du promoteur neuronal Thy1. Chez ces souris, les transgènes sont exprimés de façon significative dès 1 mois et des plaques amyloïdes sont retrouvées au niveau de l'hippocampe aux alentours de 6 mois (Radde et al., 2006). Chez la souris, Thy1 s'exprime à partir de 14 jours dans la région CA1 de l'hippocampe (Porrero et al., 2010). On peut donc considérer qu'une surproduction du peptide A $\beta_{1.42}$ se mette en place dès 14 jours. Chez la souris APP/PS1-21 âgée de 5 à 9 mois, Delekate et collaborateurs ont mis en évidence une hyperactivité calcique astrocytaire à proximité des plaques amyloïdes dans le cortex (Delekate et al., 2014). Cette étude confirme le fait que la surproduction d'A β 0 induira à terme une hyperactivité calcique du réseau astrocytaire. Cependant, cette étude ne concerne que les stades tardifs de la pathologie, lorsque différents processus inflammatoires et compensatoires ont pu se mettre en place.

Afin d'étudier l'impact de cette surproduction d'A β sur l'activité astrocytaire dans les phases précoces de la pathologie, c'est-à-dire avant l'apparition de l'astrogliose, nous avons décidé d'étudier l'activité calcique astrocytaire chez des souris âgées de 17 à 28 jours.

Sur notre modèle de souris transgéniques, nous n'avons pas observé de différence dans la proportion d'astrocytes actifs entre les lignées APP/PS1-21 et WT (souris issues de la même portée mais non transgéniques) âgées de 3 semaines. Cependant, nous notons une tendance à l'augmentation de la fréquence de ces activités calciques. Ainsi, la distribution des fréquences d'activité évolue en faveur d'une loi de Poisson différente chez APP/PS1-21 de celle des souris WT. La loi de Poisson est une loi de probabilité discrète qui décrit le comportement du nombre d'évènements se produisant dans un laps de temps fixé (si ces évènements se produisent avec une fréquence moyenne connue et indépendante du temps écoulé depuis l'évènement précédent). Ainsi, pour les souris WT, les hautes fréquences représentent des évènements rares, tandis que pour les souris APP/PS1-21, les hautes fréquences deviennent des évènements récurrents, induisant un décalage vers la droite de la courbe, et s'accompagnant d'une plus grande proportion d'astrocytes classés comme hyperactifs. Ces tendances reflètent probablement une étape de transition vers l'hyperactivité calcique observée dans les stades tardifs de la maladie d'Alzheimer (Delekate et al., 2014; Kuchibhotla et al., 2009). De manière intéressante, les mêmes profils avaient été observés avec un apport exogène d'Aßo et, de la même manière, avaient été restaurés vers des profils physiologiques par l'inhibition de TRPA1. Cette cohérence valide la signification biologique de l'étude de ces distributions.

Au niveau des prolongements astrocytaires, le nombre de microdomaines actifs est plus important chez les souris APP/PS1-21, bien que nous soyons juste au-dessus du seuil de significativité (p = 0,052). Etant donnée l'aspect récent de la surproduction d'A β à ces stades et le caractère évolutif de l'hyperactivité calcique se mettant en place dans ce modèle de souris transgéniques, un effectif plus important permettrait probablement de conforter cette tendance. Dans le même sens, l'étude des fréquences des activités calciques dans les microdomaines montre une augmentation significative chez les souris APP/PS1-21. Cette augmentation s'accompagne également d'une augmentation de la proportion des activités *expanded*. Ainsi, l'hyperactivité calcique qui se met en place suite à la surproduction d'A β , semble, à ces âges très précoces, se manifester par des modifications subtiles des paramètres de la signalisation calcique. Ceci va dans le sens d'un effet progressif, cumulatif, compensable et peut-être réversible dans les phases cellulaires critiques de la pathologie (De Strooper and Karran, 2016).

De manière intéressante, l'application de l'inhibiteur de TRPA1 chez les souris APP/PS1-21, permet d'inverser l'ensemble de ces différents effets et tendances. Ces résultats suggèrent donc, que la surproduction d'A β se traduit par la mise en place d'une perturbation précoce de l'activité calcique astrocytaire dépendante de TRPA1. Cette phase d'évolution impacte les astrocytes probablement en amont des dysfonctions synaptiques.

Dans une étude récente, une lignée double transgénique, générée en croisant la souris APP_{swe}/PS1_{dE9} à une souche TRPA1^{-/-}, a été mise au point (Lee et al., 2016). Chez ces souris, à l'âge de 8 mois, les performances lors de tests comportementaux mettant en jeu la mémoire spatiale (piscine de Morris) sont meilleures que pour les souris simple transgéniques APP_{swe}/PS1_{dE9}. Ainsi, le blocage de l'expression au long terme de TRPA1 semble préserver ces souris des déficits cognitifs, malgré la surproduction chronique d'Aβo et l'augmentation de l'astrogliose. Dans cette étude, analyser l'évolution de l'activité calcique entre les souris APP_{swe}/PS1_{dE9} et APP_{swe}/PS1_{dE9} x TRPA1^{-/-}, aurait permis de déterminer si l'hyperactivité astrocytaire se met en place et de mettre en relation l'inhibition de l'hyperactivité calcique de façon chronique avec l'amélioration des performances cognitives. De manière complémentaire il serait intéressant pour la suite de notre projet d'administrer, par exemple dans l'eau de boisson des animaux (Eid et al., 2008) ou par injection intrapéritonéale

(Mcnamara et al., 2007), l'inhibiteur spécifique de TRPA1 (HC 030031) aux souris APP/PS1-21. Cette procédure nous permettrait, de vérifier si l'inhibition tardive de TRPA1, peut restaurer les performances cognitives chez des animaux malades, après l'apparition des symptômes.

En parallèle de l'étude de l'activité calcique chez les souris APP/PS1-21, nous avons observé par western-blot au niveau de l'hippocampe, une augmentation significative de l'expression de TRPA1 à partir d'un mois, par rapport à la lignée sauvage. Afin de nous assurer que la surexpression de TRPA1 soit purement astrocytaire, nous avons entrepris de purifier des gliosomes (fractions membranaires gliales enrichies en marqueurs gliaux tel que GFAP) et des synaptosomes (fractions membranaires neuronales enrichies en marqueurs synaptiques tels que PSD-95 et synaptophysine) à partir de lysats d'hippocampe (Carney et al., 2014). Cependant, il nous a été difficile d'obtenir un enrichissement suffisamment satisfaisant pour conclure puisque des contaminations astrocytaires importantes (marquage GFAP) étaient présentes dans la fraction synaptosomale et des contaminations synaptosomales (marquage PSD-95) dans les gliosomes (données non présentées). Dans ces préparations, il est de plus difficile de prévoir quelles portions membranaires gliales constituent les gliosomes (somatique vs. arborisation distale). A l'heure actuelle, peu d'anticorps dirigés contre TRPA1 sont disponibles et leur spécificité semble discutable. De plus, TRPA1 présente de fortes homologies avec TRPV1 et ces deux canaux sont souvent co-exprimés au niveau des neurones sensoriels. Il est pour le moment, par manque d'outils adaptés, difficile d'apporter une preuve « physique » de son expression spécifiquement astrocytaire au niveau de l'hippocampe. Néanmoins, de fortes preuves fonctionnelles de sa spécificité astrocytaire au niveau de l'hippocampe, ainsi qu'une détection d'ARNm spécifiquement astrocytaires ont été précédemment apportées (Shigetomi et al., 2012b, 2013a). Nos résultats nous orientent également dans le sens de cette spécificité et d'un enrichissement astrocytaire. Enfin, les travaux de Lee et collaborateurs sur un autre modèle de souris transgéniques pour la maladie d'Alzheimer(APP_{swe}/PS1_{dE9}), observent également une surexpression de TRPA1 en westernblot à l'âge de 8 mois et décrivent une spécificité astrocytaire du marquage au sein de l'hippocampe (Lee et al., 2016).

6.4. Répercussion de l'hyperactivité calcique astrocytaire sur la transmission synaptique glutamatergique.

Les premiers symptômes de la maladie d'Alzheimer, sont fortement liés aux dysfonctions puis à la perte des synapses. Les astrocytes participent activement au fonctionnement de ces synapses (Haydon, 2001; Haydon and Nedergaard, 2015). Ainsi, nous avons cherché à mettre en lumière le lien possible entre l'hyperactivité calcique que nous avons décrite et l'activité synaptique basale des synapses glutamatergiques.

Dans l'intention de décrypter les changements précoces induits par A β o, nous avons choisi d'étudier l'activité synaptique glutamatergique basale, en mesurant les sEPSC (*spontaneous excitatory post synaptic currents*). Les sEPSC reflètent l'activation des récepteurs aux neurotransmetteurs du neurone post-synaptique suite à une libération présynaptique de transmetteurs et se traduisent par l'apparition d'un courant entrant (entrée de cations) enregistrable par des mesures électrophysiologiques. Les neurones reçoivent généralement différentes afférences, excitatrices et inhibitrices, la mesure des sEPSC reflète la sommation de ces différents évènements au niveau post-synaptique. Ainsi, cette mesure permet, de quantifier la transmission synaptique en temps réel. L'hyperactivité calcique astrocytaire que nous avons identifiée se met en place dès 5 minutes d'incubations avec A β o. A cette échelle temporelle, seule l'étude de l'activité synaptique basale permet de déterminer si les modifications d'activité astrocytaire peuvent avoir un impact sur l'activité électrique neuronale.

Des études précédentes avaient mis en évidence des perturbations de l'activité synaptique sur culture neuronale en présence d'Aßo, qui se traduisaient par une activation excessive des récepteurs NMDA. L'utilisation d'inhibiteurs des récepteurs NMDA activés, tels que le MK-801 ou la mémantine (utilisée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer) permettent de bloquer l'augmentation de l'activité synaptique induite par Aßo (Brito-Moreira et al., 2011; De Felice et al., 2007; Shankar et al., 2007). Sur tranche aigue d'hippocampe de souris, nous avons observé, dès 5 minutes d'application d'Aßo, une augmentation de la fréquence des sEPSC de plus de 200 %. Cette augmentation de fréquence des sEPSC se produit selon le même décours temporel que l'hyperactivité calcique astrocytaire induite par Aßo. De plus, l'inhibition de l'hyperactivité calcique astrocytaire (par l'inhibition de TRPA1) permet de bloquer en retour l'hyperactivité neuronale que nous observos. Dans leur étude, Brito-Moreira et collaborateurs ont également observé une augmentation de la fréquence des sEPSC

après 15 minutes d'incubation de 500 nM d'Aβo sur tranche aigue d'hippocampe de rat (Brito-Moreira et al., 2011). Ainsi, ils ont corrélé cette augmentation à l'activation des récepteurs NMDA observée en parallèle sur culture neuronale. Cependant, dans un environnement plus intégré comme la tranche aigue, le récepteur NMDA n'est probablement pas la seule cible d'Aβo. Nos résultats suggèrent que sur tranche aigue, l'hyperactivité neuronale se mettent en place plus rapidement (dès 5 minutes) et soit dépendante de l'hyperactivité calcique astrocytaire, puisque l'application d'Aβo, couplée à l'inhibition de TRPA1, prévient l'augmentation de fréquence des sEPSC précédemment observée. L'hyperactivité neuronale précoce semble donc être la résultante des modifications de l'activité calcique astrocytaire et implique donc une communication avec le partenaire astrocytaire.

L'application d'inhibiteurs pharmacologiques des récepteurs AMPA et NMDA tels que le NBQX et l'AP5 respectivement (2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline-2,3dione et Acide D,L-2-amino-5-phosphonopentanoique), couplée à l'étude de paramètres électrophysiologiques, tels que le *rise time* et *decay time* des sEPSC permettrait de déterminer quelles composantes post-synaptiques (AMPA et/ou NMDA) des sEPSC sont affectées par Aβo. L'apport exogène d'Aβo induit une augmentation de la fréquence des sEPSC qui perdure pendant au moins 30 minutes. Les modifications de l'activité synaptique au long terme (LTP et LTD) seraient, dans un second temps, des paramètres intéressants à prendre en compte afin de déterminer l'implication astrocytaire et de TRPA1 dans les mécanismes se mettant en place plus tardivement.

L'hyperactivité calcique astrocytaire que nous avons observée se met également en place précocement chez la souris APP/PS1-21. De plus, des mesures électrophysiologiques sur tranche et *in vivo*, des neurones pyramidaux de CA1 chez un modèle de souris transgéniques (APP_{swe}/PS1_{M146V}) âgées de 10 à 14 mois, ont révélé une augmentation de la fréquence des sEPSC et du nombre de potentiels d'actions (Šišková et al., 2014). Chez ces souris, entre 2 et 4 mois (en absence de plaques amyloïdes), les auteurs n'ont pas noté d'augmentation du nombre de potentiels d'actions mais n'ont pas étudié l'évolution de la fréquence des sEPSC. Il sera donc intéressant d'investiguer si l'hyperactivité neuronale est présente dès la surproduction d'A β o (c'est-à-dire sur des souris âgées de 3 semaines) et si l'inhibition de TRPA1 permet son blocage dans notre modèle de souris transgéniques.

Discussion et perspectives

Dans ce contexte, une des perspectives de ce travail sera d'identifier quels sont les transmetteurs impliqués dans cette interaction neurone-astrocyte. Dans un premier temps, l'attention sera portée sur le glutamate et la D-sérine. Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, sur des co-cultures de neurones et d'astrocytes corticaux de rat, l'application de faibles quantités d'A_{β1-42} (de 55 pM à 250 nM) induit une libération de glutamate par les astrocytes (Talantova et al., 2013). Plusieurs études démontrent également des défauts de recapture du glutamate par les astrocytes en présence d'Aßo, pouvant activer les récepteurs NMDA synaptiques et extrasynaptiques (de Ceballos et al., 2001; Harris et al., 1996; Parpura-Gill et al., 1997; Talantova et al., 2013). L'hypothèse d'une transmission glutamatergique d'origine astrocytaire pourrait donc faire le lien entre l'hyperactivité calcique astrocytaire et les premières perturbations de l'activité neuronale. Des résultats préliminaires, obtenus par un étudiant en Master 2 de notre laboratoire (Adrien Paumier), ont permis de confirmer ces résultats grâce à l'utilisation d'un senseur fluorescent du glutamate (iGluSnFR) sur des cultures primaires de neurones hippocampaux. Ce senseur est actuellement à l'étude dans le modèle de tranches aigues d'hippocampe. En parallèle, il est possible que la D-sérine, qui est un co-agoniste du récepteurs NMDA libéré majoritairement par les astrocytes (Mothet et al., 2015) et dont la libération semble dépendante de l'activité calcique astrocytaire (Mothet et al., 2005), soit également libérée par les astrocytes en présence d'Aßo. Des études pharmacologiques (par inhibition de la sérine racémase et par dégradation enzymatique de la D-sérine extracellulaire avec la DAAO) permettront de mettre en évidence son implication dans l'hyperexcitabilité neuronale enregistrée en présence d'Aβo.

Enfin, il serait important d'identifier le mécanisme de libération, du ou des, gliotransmetteurs participants à l'hyperactivité neuronale. Les augmentations d'activité calcique que nous avons observées pourraient induire une exocytose de gliotransmetteurs (Araque et al., 2014). Néanmoins, il serait difficile d'étudier l'implication de ce mécanisme sur tranche aigue, car certains transporteur vésiculaires tels que les VGLUT sont également exprimés par les neurones. De plus, la spécificité des techniques (par utilisation de souris dominante négative SNARE et injections astrocytaires de toxines clivant les SNARE) ciblant l'inactivation de certains complexes SNARE (Jourdain et al., 2007; Pascual et al., 2005) au niveau astrocytaire est soumis à débat (Bazargani and Attwell, 2016). Cependant, il est également connu que l'ouverture de certains hémicanaux dépend de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ astrocytaire (Yi et al., 2016). Dans le contexte de l'hyperactivité calcique mise en évidence ici, ces hémicanaux pourraient également participer à libération de gliotransmetteurs

excitateurs. En parallèle, le canal Best-1, qui est exprimé au niveau des prolongements astrocytaires et activé par les augmentations de Ca^{2+} intracellulaire, pourrait, comme dans les phases tardives de la pathologie (Jo et al., 2014), participer aux libérations précoces de gliotransmetteurs. Ainsi, les libérations de glutamate et de D-sérine astrocytaires couplées aux défauts de recapture du glutamate, aboutiraient à une excitation anormale des récepteurs NMDA neuronaux, participant, à terme, à l'excitotoxicité et à la détérioration de la transmission synaptique.

En résumé, nous pouvons imaginer que l'hyperactivité neuronale que nous avons observée représente une détérioration de la qualité de la transmission synaptique précoce et participe à terme à l'excitotoxicité synaptique. La prise en compte des mécanismes astrocytaires, capables de moduler la transmission synaptique, semble être un élément primordial afin de préserver l'intégrité synaptique dans la maladie d'Alzheimer.

6.5. Conclusion.

Durant ces travaux de thèse, nous avons mis en évidence l'implication du réseau et des prolongements astrocytaires dans l'hyperactivité calcique induite par les formes oligomériques solubles du peptide amyloïde β . Cette implication astrocytaire lors des premières phases de la maladie d'Alzheimer, est dépendante de l'activation du canal TRPA1. En effet, l'inhibition de ce canal est suffisante pour bloquer l'hyperactivité calcique astrocytaire et l'hyperactivité neuronale (**Figure 38**).



Figure 38 Proposition du mode d'action précoce d'Aβo sur l'activité calcique astrocytaire et sur la transmission synaptique neuronale. (1) L'Aβ sous forme oligomérique active directement ou indirectement (1') au niveau somatique et au niveau des prolongements astrocytaires le canal TRPA1. L'activation de TRPA1 induit des entrées de calcium astrocytaire. (2) L'augmentation des activités calciques astrocytaires est probablement liée à des libérations de gliotransmetteurs (2') qui induisent l'augmentation de fréquences des sEPSC au niveau neuronal. L'inhibition pharmacologique de TRPA1 permet de bloquer les effets décrits en (1) et (2).

En résumé, nous avons mis en évidence un impact très précoce du peptide $A\beta$ sur la signalisation calcique astrocytaire, avant la mise en place de l'astrogliose et des processus inflammatoires. L'étude des conséquences de cet impact, à l'interface de la communication neurone-astrocyte, représente la suite de ce travail. La régulation de l'activité calcique astrocytaire pourrait être un facteur clé dans l'évolution de la pathologie et découler sur de nouvelles opportunités thérapeutiques à l'avenir.

Les mécanismes astrocytaires décrits dans ce manuscrit ne sont probablement pas les seuls à être impactés dans les phases précoces de la maladie d'Alzheimer. De la même manière, les interactions neurone-glie regroupent possiblement un plus vaste niveau d'intégration qu'entre neurones et astrocytes.

Depuis une vingtaine d'années, l'émulation scientifique autour des astrocytes ne cesse d'augmenter et d'apporter de nouvelles connaissances. Cette étude et ses perspectives, s'inscrivent parfaitement dans la vision holistique proposée très récemment (De Strooper and Karran, 2016) qui semble indispensable à prendre en compte si l'on souhaite décrypter les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la neurodégénérescence et éventuellement, inverser le phénomène dans les étapes critiques des premières atteintes synaptiques.

Références



Aarsland, D., Marsh, L., and Schrag, A. (2009). Neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease. Mov. Disord. 24, 2175–2186.

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.

Ahmed, M., Davis, J., Aucoin, D., Sato, T., Ahuja, S., Aimoto, S., Elliott, J.I., Van Nostrand, W.E., and Smith, S.O. (2010). Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils. Nat. Struct. Mol. Biol. *17*, 561–567.

Akopian, G., Kressin, K., Derouiche, A., and Steinhäuser, C. (1996). Identified glial cells in the early postnatal mouse hippocampus display different types of Ca2+ currents. Glia *17*, 181–194.

Alberdi, E., Wyssenbach, A., Alberdi, M., Sánchez-Gómez, M. V., Cavaliere, F., Rodríguez, J.J., Verkhratsky, A., and Matute, C. (2013). Ca2+-dependent endoplasmic reticulum stress correlates with astrogliosis in oligomeric amyloid??-treated astrocytes and in a model of Alzheimer's disease. Aging Cell *12*, 292–302.

Amiry-Moghaddam, M., and Ottersen, O.P. (2003). The molecular basis of water transport in the brain. Nat. Rev. Neurosci. *4*, 991–1001.

Amran, M.S., Homma, N., and Hashimoto, K. (2003). Pharmacology of KB-R7943: a Na+-Ca2+ exchange inhibitor. Cardiovasc. Drug Rev. *21*, 255–276.

Anderson, C.M., and Swanson, R.A. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. Glia *32*, 1–14.

Andersson, M., Blomstrand, F., and Hanse, E. (2007). Astrocytes play a critical role in transient heterosynaptic depression in the rat hippocampal CA1 region. J. Physiol. *585*, 843–852.

Angulo, M.C., Le Meur, K., Kozlov, A.S., Charpak, S., and Audinat, E. (2008). GABA, a forgotten gliotransmitter. Prog. Neurobiol. *86*, 297–303.

ANTONIO MARTINEZ-HERNANDEZ, K.P.B., and MICHAEL D. NORENBERG (1977). Glutamine synthetase: glial localization in brain. Science (80-.).

Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., and Haydon, P.G. (1998a). Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. Eur. J. Neurosci. *10*, 2129–2142.

Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., and Haydon, P.G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. Trends Neurosci. 22, 208–215.

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, Sanzgiri, R.P., Parpura, V., and Haydon, P.G. (1998b). Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. J. Neurosci. *18*, 6822–6829.

B

Bataveljić, D., Nikolić, L., Milosević, M., Todorović, N., and Andjus, P.R. (2012). Changes in the astrocytic aquaporin-4 and inwardly rectifying potassium channel expression in the brain of the amyotrophic lateral sclerosis SOD1G93A rat model. Glia *60*, 1991–2003.

Bazargani, N., and Attwell, D. (2016). Astrocyte calcium signaling: the third wave. Nat. Neurosci. 19, 182–189.

Becerril-Ortega, J., Bordji, K., Fréret, T., Rush, T., and Buisson, A. (2014). Iron overload accelerates neuronal amyloid- β production and cognitive impairment in transgenic mice model of Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging *35*, 2288–2301.

Benfenati, V., and Ferroni, S. (2010). Water transport between CNS compartments: functional and molecular interactions between aquaporins and ion channels. Neuroscience *168*, 926–940.

Berger, T. (1995). AMPA-type glutamate receptors in glial precursor cells of the rat corpus callosum: ionic and pharmacological properties. Glia *14*, 101–114.

Bergeron, R., Meyer, T.M., Coyle, J.T., and Greene, R.W. (1998). Modulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by glycine transport. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 15730– 15734.

Bernardinelli, Y., Magistretti, P.J., and Chatton, J. (2004). Astrocytes generate Na+ -mediated metabolic waves. 2004, 3–8.

Bernardinelli, Y., Randall, J., Janett, E., Nikonenko, I., K??nig, S., Jones, E.V., Flores, C.E., Murai, K.K., Bochet, C.G., Holtmaat, A., et al. (2014a). Activity-dependent structural plasticity of perisynaptic astrocytic domains promotes excitatory synapse stability. Curr. Biol. *24*, 1679–1688.

Bernardinelli, Y., Muller, D., and Nikonenko, I. (2014b). Astrocyte-Synapse Structural Plasticity. 2014.

Berridge, M.J. (2010). Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 459, 441–449.

Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2003). Calcium: Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4, 517–529.

Bevan, S., Chiu, S.Y., Gray, P.T.A., and Ritchie, J.M. (1985). The Presence of Voltage-Gated Sodium, Potassium and Chloride Channels in Rat Cultured Astrocytes. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. *225*, 299–313.

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.

Black, J.A., Newcombe, J., and Waxman, S.G. (2010). Astrocytes within multiple sclerosis

lesions upregulate sodium channel Nav1.5.

Bordey, And, and Sontheimer (1997). Postnatal Development of Ionic Currents in Rat Hippocampal Astrocytes In Situ. J. Neurophysiol.

Bosson, A., Boisseau, S., Buisson, A., Savasta, M., and Albrieux, M. (2015). Disruption of dopaminergic transmission remodels tripartite synapse morphology and astrocytic calcium activity within substantia nigra pars reticulata. Glia *63*, 673–683.

Bourin, M., Ripoll, N., and Dailly, E. (2003). Nicotinic receptors and Alzheimer's disease. Curr. Med. Res. Opin. 19, 169–177.

Braak, H., and Braak, E. (1991). Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. Brain Pathol. *1*, 213–216.

Brito-Moreira, J., Paula-Lima, a C., Bomfim, T.R., Oliveira, F.B., Sepúlveda, F.J., De Mello, F.G., Aguayo, L.G., Panizzutti, R., and Ferreira, S.T. (2011). A β oligomers induce glutamate release from hippocampal neurons. Curr. Alzheimer Res. *8*, 552–562.

Burda, J.E., and Sofroniew, M. V. (2014). Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. Neuron *81*, 229–248.

Burnstock, G., B. Fredholm, B., and Verkhratsky, A. (2011). Adenosine and ATP Receptors in the Brain. Curr. Top. Med. Chem. *11*, 973–1011.

Buscemi, L., Ginet, V., Lopatar, J., Montana, V., Pucci, L., Spagnuolo, P., Zehnder, T., Grubi, V., Truttman, A., Sala, C., et al. (2016). Homer1 Scaffold Proteins Govern Ca 2 + Dynamics in Normal and Reactive Astrocytes. 1–20.

Busciglio, J., Pelsman, A., Wong, C., Pigino, G., Yuan, M., Mori, H., and Yankner, B.A. (2002). Altered metabolism of the amyloid beta precursor protein is associated with mitochondrial dysfunction in Down's syndrome. Neuron *33*, 677–688.

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.

С

Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., et al. (2008). A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function. J. Neurosci. *28*, 264–278.

Cai, Z., Schools, G.P., and Kimelberg, H.K. (2000). Metabotropic glutamate receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes: Developmental changes of mGluR5 mRNA and functional expression. Glia *29*, 70–80.

Carlson, M.C., Helms, M.J., Steffens, D.C., Burke, J.R., Potter, G.G., and Plassman, B.L. (2008). Midlife activity predicts risk of dementia in older male twin pairs. Alzheimers. Dement. *4*, 324–331.

Carney, K.E., Milanese, M., Van Nierop, P., Li, K.W., Oliet, S.H.R., Smit, A.B., Bonanno,

G., and Verheijen, M.H.G. (2014). Proteomic analysis of gliosomes from mouse brain: Identification and investigation of glial membrane proteins. J. Proteome Res. *13*, 5918–5927.

D

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.

de Ceballos, M.L., Brera, B., and Fernández-Tomé, M.P. (2001). beta-Amyloid-induced cytotoxicity, peroxide generation and blockade of glutamate uptake in cultured astrocytes. Clin. Chem. Lab. Med. *39*, 317–318.

Chen, C., Jiang, P., Xue, H., Peterson, S.E., Tran, H.T., McCann, A.E., Parast, M.M., Li, S., Pleasure, D.E., Laurent, L.C., et al. (2014). Role of astroglia in Down's syndrome revealed by patient-derived human-induced pluripotent stem cells. Nat. Commun. *5*, 4430.

Cheung, G., Chever, O., and Rouach, N. (2014). Connexons and pannexons: newcomers in neurophysiology. Front. Cell. Neurosci. *8*, 348.

Chiu, F.C., and Norton, W.T. (1982). The cytoskeleton of primary astrocytes in culture contains actin, glial fibrillary acidic protein, and the fibroblast-type filament protein, vimentin. J. Neurochem. *39*, 1252–1260.

Chow, S.-K., Yu, D., Macdonald, C.L., Buibas, M., and Silva, G. a (2010). Amyloid β -peptide directly induces spontaneous calcium transients, delayed intercellular calcium waves and gliosis in rat cortical astrocytes. ASN Neuro 2, e00026.

Cleary, J.P., Walsh, D.M., Hofmeister, J.J., Shankar, G.M., Kuskowski, M.A., Selkoe, D.J., and Ashe, K.H. (2005). Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. Nat. Neurosci. *8*, 79–84.

Connelly, P.J., and Prentice, N.P. (2005). Current smoking and response to cholinesterase inhibitor therapy in Alzheimer's disease. Dement. Geriatr. Cogn. Disord. *19*, 11–14.

Conti, F., Minelli, A., and Melone, M. (2004). GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. Brain Res. Rev. 45, 196–212.

Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S., and Smith, S.J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. Science 247, 470–473.

Crimins, J.L., Pooler, A., Polydoro, M., Luebke, J.I., and Spires-Jones, T.L. (2013). The intersection of amyloid beta and tau in glutamatergic synaptic dysfunction and collapse in Alzheimer's disease. Ageing Res. Rev. *12*, 757–763.

D'Ambrosio, R., Wenzel, J., Schwartzkroin, P. a, McKhann, G.M., and Janigro, D. (1998). Functional specialization and topographic segregation of hippocampal astrocytes. J. Neurosci. *18*, 4425–4438.

Dallérac, G., and Rouach, N. (2016). Astrocytes as new targets to improve cognitive functions. Prog. Neurobiol. 1–20.

Danbolt, N.C., Storm-Mathisen~, J., and Kanner~, B.I. (1992). AN [Na++ K+]COUPLED L-GLUTAMATE TRANSPORTER PURIFIED FROM RAT BRAIN IS LOCATED IN GLIAL CELL PROCESSES. Neuroscience *51*, 295–310.

Darmellah, A., Rayah, A., Cuif, M., Prigent, M., Arpin, M., Alcover, A., and Kanellopoulos, J.M. (2012). Ezrin / Radixin / Moesin Are Required for the Purinergic P2X7 Receptor (P2X7R)-dependent Processing of the Amyloid Precursor Protein *.

Davies, C.A., Mann, D.M., Sumpter, P.Q., and Yates, P.O. (1987). A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. J. Neurol. Sci. 78, 151–164.

De Strooper, B., and Karran, E. (2016). The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. Cell *164*, 603–615.

Delekate, A., Füchtemeier, M., Schumacher, T., Ulbrich, C., Foddis, M., and Petzold, G.C. (2014). Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. Nat. Commun. *5*, 5422.

Diaz-Hernandez, J.I., Gomez-Villafuertes, R., Le??n-Otegui, M., Hontecillas-Prieto, L., del Puerto, A., Trejo, J.L., Lucas, J.J., Garrido, J.J., Gualix, J., Miras-Portugal, M.T., et al. (2012). In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3?? and secretases. Neurobiol. Aging *33*, 1816–1828.

Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. Cell *97*, 703–716.

Doyle, J.P., Dougherty, J.D., Heiman, M., Schmidt, E.F., Stevens, T.R., Ma, G., Bupp, S., Shrestha, P., Shah, R.D., Doughty, M.L., et al. (2008). Application of a Translational Profiling Approach for the Comparative Analysis of CNS Cell Types. Cell *135*, 749–762.

Ε

Eid, S.R., Crown, E.D., Moore, E.L., Liang, H. a, Choong, K.-C., Dima, S., Henze, D. a, Kane, S. a, and Urban, M.O. (2008). HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. Mol. Pain *4*, 48.

Emsley, J.G., and Macklis, J.D. (2006). Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronaldefined anatomy of the adult murine CNS. Neuron Glia Biol. *2*, 175–186.

Eroglu, C., and Barres, B.A. (2010). Regulation of synaptic connectivity by glia. Nature *468*, 223–231.

Ettle, B., Schlachetzki, J.C.M., and Winkler, J. (2016). Oligodendroglia and Myelin in Neurodegenerative Diseases: More Than Just Bystanders? Mol. Neurobiol. *53*, 3046–3062.

F

De Felice, F.G., Velasco, P.T., Lambert, M.P., Viola, K., Fernandez, S.J., Ferreira, S.T., and Klein, W.L. (2007). Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-

D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. J. Biol. Chem. *282*, 11590–11601.

Fernandes, E., Fernandes, M., Keeble, J., and Elizabeth Keeble, J. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves.

Ferrer, I., and Gullotta, F. (1990). Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus. Acta Neuropathol. *79*, 680–685.

Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., et al. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. Lancet (London, England) *366*, 2112–2117.

Fiacco, T.A., Agulhon, C., Taves, S.R., Petravicz, 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.

Fiacco, T.A., Agulhon, C., and McCarthy, K.D. (2009). Sorting Out Astrocyte Physiology from Pharmacology. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *49*, 151–174.

Fields, R.D., and Burnstock, G. (2006). Purinergic signalling in neuron–glia interactions. Nat. Rev. Neurosci. 7, 423–436.

Fitzjohn, S.M., Morton, R.A., Kuenzi, F., Rosahl, T.W., Shearman, M., Lewis, H., Smith, D., Reynolds, D.S., Davies, C.H., Collingridge, G.L., et al. (2001). Age-related impairment of synaptic transmission but normal long-term potentiation in transgenic mice that overexpress the human APP695SWE mutant form of amyloid precursor protein. J. Neurosci. *21*, 4691–4698.

Francis, P.T. (2003). Glutamatergic systems in Alzheimer's disease.

Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D.A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M.C., et al. (2002). aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. Dev. Cell *3*, 85–97.

Frandemiche, M.L., De Seranno, S., Rush, T., Borel, E., Elie, a, Arnal, I., Lante, F., and Buisson, a (2014). Activity-dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid-Beta oligomers. J Neurosci *34*, 6084–6097.

Fraser, D.D., Mudrick-donnon, L.A., Macvicar, B.A., and Al, F.E.T. (1994). Astrocytic GABA Receptors. Glia *93*, 83–93.

Fratiglioni, L., Paillard-Borg, S., and Winblad, B. (2004). An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia. Lancet. Neurol. *3*, 343–353.

G

Garcia, O., Torres, M., Helguera, P., Coskun, P., and Busciglio, J. (2010). A role for thrombospondin-1 deficits in astrocyte-mediated spine and synaptic pathology in Down's syndrome. PLoS One *5*, e14200.

García-Krauss, A., Ferrada, L., Astuya, A.P., Salazar, K., Cisternas, P., Martínez, F., Ramírez,

E., and Nualart, F. (2015). Dehydroascorbic acid promotes cell death in neurons under oxidative stress: a protective role for astrocytes. Mol. Neurobiol. 1–17.

Garwood, C.J., Pooler, A.M., Atherton, J., Hanger, D.P., and Noble, W. (2011). Astrocytes are important mediators of $A\beta$ -induced neurotoxicity and tau phosphorylation in primary culture. Cell Death Dis. 2, e167.

Giaume, C. (2010). Astroglial Wiring is Adding Complexity to Neuroglial Networking. Front. Neuroenergetics *2*, 129.

Giaume, C., Leybaert, L., C. Naus, C., and C. Sáez, J. (2013a). Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. Front. Pharmacol. *4*, 88.

Giaume, C., Leybaert, L., Naus, C.C., and Sáez, J.C. (2013b). Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: Properties, pharmacology, and roles. Front. Pharmacol. *4 JUL*, 1–17.

Golovina, V.A. (2005). Visualization of localized store-operated calcium entry in mouse astrocytes. Close proximity to the endoplasmic reticulum. J. Physiol. *564*, 737–749.

Gomes, A., Fernandes, E., and Lima, J.L.F.C. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. J. Biochem. Biophys. Methods *65*, 45–80.

Graber, E., Chacko, E., Regelmann, M.O., Costin, G., and Rapaport, R. (2012). Down syndrome and thyroid function. Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 41, 735–745.

Graeber, M.B., Kösel, S., Egensperger, R., Banati, R.B., Müller, U., Bise, K., Hoff, P., Möller, H.J., Fujisawa, K., and Mehraein, P. (1997). Rediscovery of the case described by Alois Alzheimer in 1911: historical, histological and molecular genetic analysis. Neurogenetics *1*, 73–80.

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.

Gu, Y., Nieves, J.W., Stern, Y., Luchsinger, J.A., and Scarmeas, N. (2010). Food combination and Alzheimer disease risk: a protective diet. Arch. Neurol. *67*, 699–706.

Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., Cruchaga, C., Sassi, C., Kauwe, J.S.K., Younkin, S., et al. (2013). TREM2 variants in Alzheimer's disease. N. Engl. J. Med. *368*, 117–127.

Η

Haass, C., and Selkoe, D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *8*, 101–112.

Haass, C., Hung, A.Y., Schlossmacher, M.G., Teplow, D.B., and Selkoe, D.J. (1993). beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. J. Biol. Chem. *268*, 3021–3024.

Halassa, M.M., Fellin, T., and Haydon, P.G. (2007). The tripartite synapse: roles for

gliotransmission in health and disease. Trends Mol. Med. 13, 54-63.

Hamilton, N.B., and Attwell, D. (2010). Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? Nat. Rev. Neurosci. *11*, 227–238.

Hamlett, E.D., Goetzl, E.J., Ledreux, A., Vasilevko, V., Boger, H.A., LaRosa, A., Clark, D., Carroll, S.L., Carmona Iragui, M., Fortea, J., et al. (2016). Neuronal exosomes reveal Alzheimer's disease biomarkers in Down syndrome. Alzheimer's Dement.

Hardt, O., Nader, K., and Wang, Y.-T. (2013). GluA2-dependent AMPA receptor endocytosis and the decay of early and late long-term potentiation: possible mechanisms for forgetting of short- and long-term memories. Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci. 369.

Harris, M.E., Wang, Y., Pedigo, N.W., Hensley, K., Butterfield, D.A., and Carney, J.M. (1996). Amyloid beta peptide (25-35) inhibits Na+-dependent glutamate uptake in rat hippocampal astrocyte cultures. J. Neurochem. *67*, 277–286.

Hartzell, H.C., Qu, Z., Yu, K., Xiao, Q., and Chien, L.-T. (2008). Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to best disease and other retinopathies. Physiol. Rev. *88*, 639–672.

Hassinger, T.D., Guthrie, P.B., Atkinson, P.B., Bennett, M. V, and Kater, S.B. (1996). An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 13268–13273.

Haydon, P.G. (2001). GLIA: listening and talking to the synapse. Nat. Rev. Neurosci. 2, 185–193.

Haydon, P.G., and Nedergaard, M. (2015). How do astrocytes participate in neural plasticity? Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 7, 1–16.

Héja, L., Barabás, P., Nyitrai, G., Kékesi, K.A., Lasztóczi, B., Toke, O., Tárkányi, G., Madsen, K., Schousboe, A., Dobolyi, A., et al. (2009). Glutamate uptake triggers transportermediated GABA release from astrocytes. PLoS One *4*, e7153.

Hornykiewicz, O. (1975). Brain monoamines and parkinsonism. Natl. Inst. Drug Abuse Res. Monogr. Ser. 13–21.

J

Jacob, C.P., Koutsilieri, E., Bartl, J., Neuen-Jacob, E., Arzberger, T., Zander, N., Ravid, R., Roggendorf, W., Riederer, P., and Grünblatt, E. (2007). Alterations in Expression of Glutamatergic Transporters and Receptors in Sporadic Alzheimer's Disease. J. Alzheimer's Dis. *11*, 97–116.

Jaquemar, D., Schenker, T., and Trueb, B. (1999). An Ankyrin-like Protein with Transmembrane Domains Is Specifically Lost after Oncogenic Transformation of Human Fibroblasts. J. Biol. Chem. *274*, 7325–7333.

Jiang, R., Diaz-Castro, B., Looger, L.L., and Khakh, B.S. (2016). Dysfunctional Calcium and Glutamate Signaling in Striatal Astrocytes from Huntington's Disease Model Mice. J. Neurosci. *36*, 3453–3470.

Jo, S., Yarishkin, O., Hwang, Y.J., Chun, Y.E., Park, M., Woo, D.H., Bae, J.Y., Kim, T., Lee, J., Chun, H., et al. (2014). GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. Nat. Med. *20*, 886–896.

Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg, S., Jonsdottir, I., Jonsson, P. V, Snaedal, J., Bjornsson, S., Huttenlocher, J., Levey, A.I., Lah, J.J., et al. (2013). Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. N. Engl. J. Med. *368*, 107–116.

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.

K

Kamphuis, W., Kooijman, L., Orre, M., Stassen, O., Pekny, M., and Hol, E.M. (2015). GFAP and vimentin deficiency alters gene expression in astrocytes and microglia in wild-type mice and changes the transcriptional response of reactive glia in mouse model for Alzheimer's disease. Glia *63*, 1036–1056.

Kékesi, O., Ioja, E., Szabó, Z., Kardos, J., and Héja, L. (2015). Recurrent seizure-like events are associated with coupled astroglial synchronization. Front. Cell. Neurosci. 9, 215.

Kervern, M., Angeli, A., Nicole, O., Leveille, F., Parent, B., Villette, V., Buisson, A., and Dutar, P. (2012). Selective impairment of some forms of synaptic plasticity by oligomeric amyloid-beta peptide in the mouse hippocampus: implication of extrasynaptic NMDA receptors. J Alzheimers Dis *32*, 183–196.

Kettenmann, H., Backus, K.H., and Schachner, M. (1984). ASPARTATE, GLUTAMATE AND 3,-AMINOBUTYRIC ACID DEPOLARIZE CULTURED ASTROCYTES. Neurosci. Lett. *52*, 25–29.

Khakh, B.S., and Sofroniew, M. V (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. Nat. Neurosci. *18*, 942–952.

Kim, J.-E., Ryu, H.J., Yeo, S.-I., Seo, C.H., Lee, B.C., Choi, I.-G., Kim, D.-S., and Kang, T.-C. (2009). Differential expressions of aquaporin subtypes in astroglia in the hippocampus of chronic epileptic rats. Neuroscience *163*, 781–789.

Kimelberg, H.K. (2004). The problem of astrocyte identity. Neurochem. Int. 45, 191–202.

Kimelberg, H.K., MacVicar, B.A., and Sontheimer, H. (2006). Anion channels in astrocytes: Biophysics, pharmacology, and function. Glia *54*, 747–757.

Kirischuk, S., Kettenmann, H., and Verkhratsky, A. (1997). Na+/Ca2+ exchanger modulates kainate-triggered Ca2+ signaling in Bergmann glial cells in situ. FASEB J. *11*, 566–572.

Kirischuk, S., Parpura, V., and Verkhratsky, A. (2012). Sodium dynamics: another key to astroglial excitability? Trends Neurosci. *35*, 497–506.

Koulakoff, A., Mei, X., Orellana, J.A., Sáez, J.C., and Giaume, C. (2012). Glial connexin expression and function in the context of Alzheimer's disease. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. *1818*, 2048–2057.

Kraft, A.W., Hu, X., Yoon, H., Yan, P., Xiao, Q., Wang, Y., Gil, S.C., Brown, J., Wilhelmsson, U., Restivo, J.L., et al. (2013). Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. FASEB J. *27*, 187–198.

Kristian Enkvist, M.O., and McCarthy, K.D. (2002). Astroglial Gap Junction Communication Is Increased by Treatment with Either Glutamate or High K+ Concentration. J. Neurochem. *62*, 489–495.

Kuchibhotla, K. V., Lattarulo, C.R., Hyman, B.T., and Bacskai, B.J. (2009). Synchronous Hyperactivity and Intercellular Calcium Waves in Astrocytes in Alzheimer Mice. Science (80-.). *323*.

Kuga, N., Sasaki, T., Takahara, Y., Matsuki, N., and Ikegaya, Y. (2011). Large-Scale Calcium Waves Traveling through Astrocytic Networks In Vivo. J. Neurosci. *31*, 2607–2614.

Kulijewicz-Nawrot, M., Verkhratsky, A., Chvátal, A., Syková, E., and Rodríguez, J.J. (2012). Astrocytic cytoskeletal atrophy in the medial prefrontal cortex of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. J. Anat. *221*, 252–262.

Kuusisto, J., Koivisto, K., Kervinen, K., Mykkänen, L., Helkala, E.L., Vanhanen, M., Hänninen, T., Pyörälä, K., Kesäniemi, Y.A., Riekkinen, P., et al. (1994). Association of apolipoprotein E phenotypes with late onset Alzheimer's disease: population based study. BMJ *309*, 636–638.

Kwan, K.Y., Allchorne, A.J., Vollrath, M.A., Christensen, A.P., Zhang, D.S., Woolf, C.J., and Corey, D.P. (2006). TRPA1 Contributes to Cold, Mechanical, and Chemical Nociception but Is Not Essential for Hair-Cell Transduction. Neuron *50*, 277–289.

L

LaFerla, F.M. (2002). Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. Nat. Rev. Neurosci. *3*, 862–872.

LaFerla, F.M., Green, K.N., and Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. Nat. Rev. Neurosci. *8*, 499–509.

Langer, J., and Rose, C.R. (2009). Synaptically induced sodium signals in hippocampal astrocytes in situ. J. Physiol. *587*, 5859–5877.

Langer, J., Stephan, J., Theis, M., and Rose, C.R. (2012). Gap junctions mediate intercellular spread of sodium between hippocampal astrocytes in situ. Glia *60*, 239–252.

Larson, J., Lynch, G., Games, D., and Seubert, P. (1999). Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice. Brain Res. *840*, 23–35.

Lavialle, M., Aumann, G., Anlauf, E., Pröls, F., Arpin, M., and Derouiche, A. (2011). Structural plasticity of perisynaptic astrocyte processes involves ezrin and metabotropic glutamate receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 12915–12919.

Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P., and Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. Neuroscience *39*, 151–170.

Lee, K.-I., Lee, H.-T., Lin, H.-C., Tsay, H.-J., Tsai, F.-C., Shyue, S.-K., and Lee, T.-S. (2016). Role of transient receptor potential ankyrin 1 channels in Alzheimer's disease. J. Neuroinflammation 13, 92.

Lee, M.-C., Ting, K.K., Adams, S., Brew, B.J., Chung, R., Guillemin, G.J., and White, A.R. (2010a). Characterisation of the Expression of NMDA Receptors in Human Astrocytes. PLoS One *5*.

Lee, S., Yoon, B.-E., Berglund, K., Oh, S.-J., Park, H., Shin, H.-S., Augustine, G.J., Lee, C.J., Farrant, M., Nusser, Z., et al. (2010b). Channel-mediated tonic GABA release from glia. Science *330*, 790–796.

Lehre, K.P., Levy, L.M., Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J., and Danbolt, N.C. (1995). Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. J. Neurosci. *15*, 1835–1853.

v Lenhossek, M. (1893) Der feinere Bau des Nervensystems im Lichte neuester Forschung, Fischer's Medicinische Buchhandlung H. Kornfield

Lesné, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kayed, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M., and Ashe, K.H. (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. Nature *440*, 352–357.

Levitan, D., Lee, J., Song, L., Manning, R., Wong, G., Parker, E., and Zhang, L. (2001). PS1 N- and C-terminal fragments form a complex that functions in APP processing and Notch signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 12186–12190.

Li, S., Mallory, M., Alford, M., Tanaka, S., and Masliah, E. (1997). Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. J. Neuropathol. Exp. Neurol. *56*, 901–911.

Lim, D., Iyer, A., Ronco, V., Grolla, A.A., Canonico, P.L., Aronica, E., and Genazzani, A.A. (2013). Amyloid Beta Deregulates Astroglial mGluR5- Mediated Calcium Signaling via Calcineurin.

Liu, Q.-S., Kawai, H., and Berg, D.K. (2001). beta -Amyloid peptide blocks the response of alpha 7-containing nicotinic receptors on hippocampal neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 4734–4739.

Μ

MacVicar, B.A., Hochman, D., Delay, M.J., and Weiss, S. (1991). Modulation of intracellular Ca++ in cultured astrocytes by influx through voltage-activated Ca++ channels. Glia *4*, 448–455.

Malarkey, E.B., Ni, Y., and Parpura, V. (2008). Ca2+ entry through TRPC1 channels contributes to intracellular Ca2+ dynamics and consequent glutamate release from rat astrocytes. Glia *56*, 821–835.

Marrero, H., and Orkand, R.K. (1996). Nerve impulses increase glial intercellular permeability. Glia 16, 285–289.

Martin, L.J., Blackstone, C.D., Levey, A.I., Huganir, R.L., and Price, D.L. (1993). AMPA

glutamate receptor subunits are differentially distributed in rat brain. Neuroscience 53, 327–358.

Martina, M., B.-Turcotte, M.-E., Halman, S., Tsai, G., Tiberi, M., Coyle, J.T., and Bergeron, R. (2005). Reduced glycine transporter type 1 expression leads to major changes in glutamatergic neurotransmission of CA1 hippocampal neurones in mice. J. Physiol. 563, 777–793.

Masliah, E., Mallory, M., Alford, M., DeTeresa, R., Hansen, L.A., McKeel, D.W., and Morris, J.C. (2001). Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. Neurology *56*, 127–129.

Mathiisen, T.M., Lehre, K.P., Danbolt, N.C., and Ottersen, O.P. (2010). The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: An electron microscopic 3D reconstruction. Glia *58*, 1094–1103.

Mattson, M.P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I., and Rydel, R.E. (1992). beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. J. Neurosci. *12*, 376–389.

Matyash, V., and Kettenmann, H. (2009). Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. Brain Res. Rev.

Mayeux, R. (2003). EPIDEMIOLOGY OF NEURODEGENERATION. Annu. Rev. Neurosci. 26, 81–104.

Mayeux, R. (2006). Genetic epidemiology of Alzheimer disease. Alzheimer Dis.Assoc.Disord. 20, S58–S62.

Mcnamara, C.R., Mandel-brehm, J., Bautista, D.M., Siemens, J., Deranian, K.L., Zhao, M., Hayward, N.J., Chong, J.A., Julius, D., Moran, M.M., et al. (2007). TRPA1 mediates formalin-induced pain. PNAS, Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am. *104*, 30.

Meda, L., Baron, P., and Scarlato, G. (2001). Glial activation in Alzheimer's disease: the role of A β and its associated proteins. Neurobiol. Aging *22*, 885–893.

Mei, X., Ezan, P., Giaume, C., and Koulakoff, A. (2010). Astroglial connexin immunoreactivity is specifically altered at??-amyloid plaques in??-amyloid precursor protein/presenilin1 mice. Neuroscience *171*, 92–105.

Milani, P., Gagliardi, S., Cova, E., Cereda, C., Milani, P., Gagliardi, S., Cova, E., and Cereda, C. (2011). SOD1 Transcriptional and Posttranscriptional Regulation and Its Potential Implications in ALS. Neurol. Res. Int. *2011*, 458427.

Miller, W.C., and DeLong, M.R. (1988). Parkinsonian symptomatology. An anatomical and physiological analysis. Ann. N. Y. Acad. Sci. *515*, 287–302.

Minelli, A., Castaldo, P., Gobbi, P., Salucci, S., Magi, S., and Amoroso, S. (2007). Cellular and subcellular localization of Na+–Ca2+ exchanger protein isoforms, NCX1, NCX2, and NCX3 in cerebral cortex and hippocampus of adult rat. Cell Calcium *41*, 221–234.

Ming, G.-L., and Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. Neuron *70*, 687–702.

Mishima, T., and Hirase, H. (2010). In Vivo Intracellular Recording Suggests That Gray Matter Astrocytes in Mature Cerebral Cortex and Hippocampus Are Electrophysiologically Homogeneous. J. Neurosci. *30*, 3093–3100.

Moechars, D., Dewachter, I., Lorent, K., Reversé, D., Baekelandt, V., Naidu, A., Tesseur, I., Spittaels, K., Haute, C. V, Checler, F., et al. (1999). Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. J. Biol. Chem. *274*, 6483–6492.

Mola, M.G., Sparaneo, A., Gargano, C.D., Spray, D.C., Svelto, M., Frigeri, A., Scemes, E., and Nicchia, G.P. (2016). The speed of swelling kinetics modulates cell volume regulation and calcium signaling in astrocytes: A different point of view on the role of aquaporins. Glia *64*, 139–154.

Montero, T.D., and Orellana, J.A. (2015). Hemichannels: New pathways for gliotransmitter release. Neuroscience 286, 45–59.

Morita, D., Rah, J.C., and Isaac, J.T.R. (2013). Incorporation of inwardly rectifying AMPA receptors at silent synapses during hippocampal long-term potentiation. Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci. 369.

Morris, A.W.J., Carare, R.O., Schreiber, S., and Hawkes, C.A. (2014). The Cerebrovascular Basement Membrane: Role in the Clearance of β -amyloid and Cerebral Amyloid Angiopathy. Front. Aging Neurosci. *6*, 251.

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.

Mothet, J.P., Le Bail, M., and Billard, J.M. (2015). Time and space profiling of NMDA receptor co-agonist functions. J. Neurochem. *135*, 210–225.

Mothet, J.-P., Pollegioni, L., Ouanounou, G., Martineau, M., Fossier, P., and Baux, G. (2005). Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 5606–5611.

de Moura, J.C., Noroes, M.M., Rachetti, V. de P.S., Soares, B.L., Preti, D., Nassini, R., Materazzi, S., Marone, I.M., Minocci, D., Geppetti, P., et al. (2014). The blockade of transient receptor potential ankirin 1 (TRPA1) signalling mediates antidepressant- and anxiolytic-like actions in mice. Br. J. Pharmacol. *171*, 4289–4299.

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.

Ν

Nagata, K., Duggan, A., Kumar, G., and García-Añoveros, J. (2005). Nociceptor and Hair Cell Transducer Properties of TRPA1, a Channel for Pain and Hearing. J. Neurosci. *25*, 4052–4061.

Nagy, J.I., and Rash, J.E. (2000). Connexins and gap junctions of astrocytes and

oligodendrocytes in the CNS. Brain Res. Rev. 32, 29-44.

Nakayama, R., Sasaki, T., Tanaka, K.F., and Ikegaya, Y. (2016). Subcellular calcium dynamics during juvenile development in mouse hippocampal astrocytes. Eur. J. Neurosci. *43*, 923–932.

Neher, E., and Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. Nature 260, 799–802.

Nett, W.J.W., Oloff, S.H.S., and McCarthy, K.D.K. (2002). Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. J. Neurophysiol. *87*, 528–537.

Neymeyer, V., Tephly, T.R., and Miller, M.W. (1997). Folate and 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase FDH expression in the central nervous system of the mature rat. Brain Res. *766*, 195–204.

Nilius, B., and Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. Genome Biol. *12*, 218.

Nilius, B., Appendino, G., and Owsianik, G. (2012). The transient receptor potential channel TRPA1: From gene to pathophysiology. Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. *464*, 425–458.

Nimmerjahn, A., Mukamel, E.A., Schnitzer, M.J., Andersson, G., Armstrong, D.M., Apps, R., Garwicz, M., Beierlein, M., Regehr, W.G., Bekar, L., et al. (2009). Motor Behavior Activates Bergmann Glial Networks. Neuron *62*, 400–412.

Nishida, H., and Okabe, S. (2007). Direct Astrocytic Contacts Regulate Local Maturation of Dendritic Spines. J. Neurosci. 27, 331–340.

0

O'Connor, E.R., Sontheimer, H., Spencer, D.D., and De Lanerolle, N.C. (1998). Astrocytes from human hippocampal epileptogenic foci exhibit action potential-like responses. Epilepsia *39*, 347–354.

Oberheim, N.A., Goldman, S.A., and Nedergaard, M. Heterogeneity of Astrocytic Form and Function.

Olabarria, M., Noristani, H.N., Verkhratsky, A., and Rodríguez, J.J. (2010). Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. Glia *58*, 831–838.

Olsen, M.L., Khakh, B.S., Skatchkov, S.N., Zhou, M., Lee, C.J., and Rouach, N. (2015). New Insights on Astrocyte Ion Channels: Critical for Homeostasis and Neuron-Glia Signaling. J. Neurosci. *35*, 13827–13835.

Orellana, J.A., Froger, N., Ezan, P., Jiang, J.X., Bennett, M.V.L., Naus, C.C., Giaume, C., and Sáez, J.C. (2011a). ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. J. Neurochem. *118*, 826–840.

Orellana, J.A., Shoji, K.F., Abudara, V., Ezan, P., Amigou, E., Saez, P.J., Jiang, J.X., Naus,

C.C., Saez, J.C., and Giaume, C. (2011b). Amyloid -Induced Death in Neurons Involves Glial and Neuronal Hemichannels. J. Neurosci. *31*, 4962–4977.

Orr, A.G., Hsiao, E.C., Wang, M.M., Ho, K., Kim, D.H., Wang, X., Guo, W., Kang, J., Yu, G.-Q., Adame, A., et al. (2015). Astrocytic adenosine receptor A2A and Gs-coupled signaling regulate memory. Nat. Neurosci. *18*, 1–17.

Osborn, L.M., Kamphuis, W., Wadman, W.J., and Hol, E.M. (2015). Astrogliosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Prog. Neurobiol.

P

Palygin, O., Lalo, U., and Pankratov, Y. (2011). Distinct pharmacological and functional properties of NMDA receptors in mouse cortical astrocytes. Br. J. Pharmacol. *163*, 1755–1766.

Panatier, A., and Robitaille, R. (2016). Astrocytic mGluR5 and the tripartite synapse. Neuroscience 323, 29–34.

Panatier, A., Vallée, J., Haber, M., Murai, K.K., Lacaille, J.C., and Robitaille, R. (2011). Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. Cell *146*, 785–798.

Panchina, Y., Kelmanson, I., Matz, M., Lukyanov, K., Usman, N., and Lukyanov, S. (2000). A ubiquitous family of putative gap junction molecules. Curr. Biol. *10*, R473–R474.

Pannasch, U., Freche, D., Dallérac, G., Ghézali, G., Escartin, C., Ezan, P., Cohen-salmon, M., Benchenane, K., Abudara, V., Dufour, A., et al. (2014). Connexin 30 sets synaptic strength by controlling astroglial synapse invasion.

Pappalardo, L.W., Samad, O.A., Black, J.A., and Waxman, S.G. (2014). Voltage-gated sodium channel Nav1.5 contributes to astrogliosis in an in vitro model of glial injury via reverse Na+/Ca2+ exchange. Glia *62*, 1162–1175.

Park, H., Oh, S.-J., Han, K.-S., Woo, D.H., Park, H., Mannaioni, G., Traynelis, S.F., and Lee, C.J. (2009). Bestrophin-1 Encodes for the Ca2+-Activated Anion Channel in Hippocampal Astrocytes. J. Neurosci. *29*, 13063–13073.

Park, H., Han, K.-S., Oh, S.-J., Jo, S., Woo, J., Yoon, B.-E., and Lee, C.J. (2013). High glutamate permeability and distal localization of Best1 channel in CA1 hippocampal astrocyte. Mol. Brain *6*, 54.

Park, H., Han, K.-S., Seo, J., Lee, J., Dravid, S.M., Woo, J., Chun, H., Cho, S., Bae, J., An, H., et al. (2015). Channel-mediated astrocytic glutamate modulates hippocampal synaptic plasticity by activating postsynaptic NMDA receptors. Mol. Brain *8*, 7.

Parpura, V., Basarsky, T.A., Liu, F., Jeftinija, K., Jeftinija, S., and Haydon, P.G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. Nature *369*, 744–747.

Parpura, V., Baker, B.J., Jeras, M., and Zorec, R. (2010). Regulated exocytosis in astrocytic signal integration. Neurochem. Int. 57, 451–459.

Parpura, V., Grubišić, V., and Verkhratsky, A. (2011). Ca 2+ sources for the exocytotic

release of glutamate from astrocytes 3. BBA - Mol. Cell Res. 1813, 984–991.

Parpura, V., Heneka, M.T., Montana, V., Oliet, S.H.R., Schousboe, A., Haydon, P.G., Stout, R.F., Spray, D.C., Reichenbach, A., Pannicke, T., et al. (2012). Glial cells in (patho)physiology. J. Neurochem. *121*, 4–27.

Parpura-Gill, A., Beitz, D., and Uemura, E. (1997). The inhibitory effects of beta-amyloid on glutamate and glucose uptakes by cultured astrocytes. Brain Res. *754*, 65–71.

Pascual, O., Casper, K.B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J.-Y., Takano, H., Moss, S.J., McCarthy, K., and Haydon, P.G. (2005). Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. Science *310*, 113–116.

Patrushev, I., Gavrilov, N., Turlapov, V., and Semyanov, A. (2013). Cell Calcium Subcellular location of astrocytic calcium stores favors extrasynaptic neuron – astrocyte communication. Cell Calcium *54*, 343–349.

Paulsen, C.E., Armache, J., Gao, Y., Cheng, Y., and Julius, D. (2015). Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. Nature *520*, 511–517.

Pekny, M., Johansson, C.B., Eliasson, C., Stakeberg, J., Wallén, A., Perlmann, T., Lendahl, U., Betsholtz, C., Berthold, C.H., and Frisén, J. (1999). Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. J. Cell Biol. *145*, 503–514.

Pellerin, L. (2010). Food for thought: the importance of glucose and other energy substrates for sustaining brain function under varying levels of activity. Diabetes Metab. *36*, S59–S63.

Pérez, E., Barrachina, M., Rodríguez, A., Torrejón-Escribano, B., Boada, M., Hernández, I., Sánchez, M., and Ferrer, I. (2007). Aquaporin expression in the cerebral cortex is increased at early stages of Alzheimer disease. Brain Res. *1128*, 164–174.

Piet, R., Poulain, D.A., and Oliet, S.H. (2002). Modulation of synaptic transmission by astrocytes in the rat supraoptic nucleus. J. Physiol. *96*, 231–236.

Platel, J.-C., Dupuis, A., Boisseau, S., Villaz, M., Albrieux, M., and Brocard, J. (2007). Synchrony of spontaneous calcium activity in mouse neocortex before synaptogenesis. Eur. J. Neurosci. *25*, 920–928.

Porrero, C., Rubio-Garrido, P., Avenda??o, C., and Clasc??, F. (2010). Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice. Brain Res. *1345*, 59–72.

Porter, J.T., and McCarthy, K.D. (1996). Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. J. Neurosci. *16*, 5073–5081.

Potokar, M., Jorgačevski, J., and Zorec, R. (2016). Astrocyte Aquaporin Dynamics in Health and Disease. Int. J. Mol. Sci. 17, 1121.

R

Radde, R., Bolmont, T., Kaeser, S.A., Coomaraswamy, J., Lindau, D., Stoltze, L., Calhoun, M.E., Jäggi, F., Wolburg, H., Gengler, S., et al. (2006). Abeta42-driven cerebral amyloidosis

in transgenic mice reveals early and robust pathology. EMBO Rep. 7, 940-946.

Rakic, P. (2003). Elusive radial glial cells: Historical and evolutionary perspective. Glia 43, 19–32.

Reitz, C., and Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. Biochem. Pharmacol. *88*, 640–651.

Reyes, R.C., Verkhratsky, A., and Parpura, V. (2012). Plasmalemmal Na+/Ca2+ exchanger modulates Ca2+-dependent exocytotic release of glutamate from rat cortical astrocytes. ASN Neuro *4*, 33–45.

Rickmann, M., and Wolff, J.R. (1995). SIOO PROTEIN EXPRESSION IN SUBPOPULATIONS OF NEURONS OF RAT BRAIN. Neuroscience 67, 977–991.

Ries, M., and Sastre, M. (2016). Mechanisms of A β Clearance and Degradation by Glial Cells. Front. Aging Neurosci. 8, 1–9.

Robel, S., and Sontheimer, H. (2015). Glia as drivers of abnormal neuronal activity. Nat. Neurosci. 19, 28–33.

Rose, C.R. (2010). Ion changes and signalling in perisynaptic glia. Brain Res. Rev. 63, 113–129.

Rose, C.R., and Verkhratsky, A. (2016). Principles of sodium homeostasis and sodium signalling in astroglia. Glia *64*, 1611–1627.

Ross, C.A., Pantelyat, A., Kogan, J., and Brandt, J. (2014). Determinants of functional disability in Huntington's disease: role of cognitive and motor dysfunction. Mov. Disord. *29*, 1351–1358.

Rubio-Moscardo, F., Setó-Salvia, N., Pera, M., Bosch-Morató, M., Plata, C., Belbin, O., Gené, G., Dols-Icardo, O., Ingelsson, M., Helisalmi, S., et al. (2013). Rare Variants in Calcium Homeostasis Modulator 1 (CALHM1) Found in Early Onset Alzheimer's Disease Patients Alter Calcium Homeostasis. PLoS One *8*, 4–11.

Rungta, R.L., Bernier, L.-P., Dissing-Olesen, L., Groten, C.J., LeDue, J.M., Ko, R., Drissler, S., and MacVicar, B.A. (2016a). Ca $^{2+}$ transients in astrocyte fine processes occur via Ca $^{2+}$ influx in the adult mouse hippocampus. Glia.

Rungta, R.L., Bernier, L.-P., Dissing-Olesen, L., Groten, C.J., LeDue, J.M., Ko, R., Drissler, S., and MacVicar, B.A. (2016b). Ca(2+) transients in astrocyte fine processes occur via Ca(2+) influx in the adult mouse hippocampus. Glia.

Rush, T., and Buisson, A. (2014). Reciprocal disruption of neuronal signaling and $A\beta$ production mediated by extrasynaptic NMDA receptors: a downward spiral. Cell Tissue Res. *356*, 279–286.

S

Sah, P., and Mahanty, N.K. (1998). Calcium-permeable AMPA receptors mediate long-term potentiation in interneurons in the amygdala. Nature *394*, 683–687.

Sasaki, T., Kuga, N., Namiki, S., Matsuki, N., and Ikegaya, Y. (2011). Locally Synchronized Astrocytes. Cereb. Cortex *21*, 1889–1900.

Saudou, F., and Humbert, S. (2016). The Biology of Huntingtin. Neuron 89, 910–926.

Scarmeas, N., Luchsinger, J.A., Schupf, N., Brickman, A.M., Cosentino, S., Tang, M.X., and Stern, Y. (2009). Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. JAMA *302*, 627–637.

Scemes, E., and Spray, D.C. (2012). Extracellular K+ and Astrocyte Signaling via Connexin and Pannexin Channels. Neurochem. Res. *37*, 2310–2316.

Scholl, U.I., Choi, M., Liu, T., Ramaekers, V.T., Hä Usler, M.G., Grimmer, J., Tobe, S.W., Farhi, A., Nelson-Williams, C., and Lifton, R.P. Seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, and electrolyte imbalance (SeSAME syndrome) caused by mutations in KCNJ10.

Schleich, C.L. (1894) Schmerzlose Operationen: Ortliche Betäubung mit indiffrenten Flüssigkeiten. Psychophysik des natürlichen und künstlichen Schlafes, Julius Springer

Seifert, G., Hüttmann, K., Binder, D.K., Hartmann, C., Wyczynski, A., Neusch, C., and Steinhäuser, C. (2009). Analysis of astroglial K+ channel expression in the developing hippocampus reveals a predominant role of the Kir4.1 subunit. J. Neurosci. *29*, 7474–7488.

Selkoe, D.J. (2002). Alzheimer's Disease Is a Synaptic Failure. Science (80-.). 298.

Selkoe, D.J. (2011). Alzheimer's disease. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 3, a004457.

Selkoe, D.J., and Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. EMBO Mol. Med. 8, 1–14.

Serrano, A., Haddjeri, N., Lacaille, J.-C., and Robitaille, R. (2006). GABAergic Network Activation of Glial Cells Underlies Hippocampal Heterosynaptic Depression. J. Neurosci. *26*, 5370–5382.

Sgourakis, N.G., Yan, Y., McCallum, S.A., Wang, C., and Garcia, A.E. (2007). The Alzheimer's peptides Abeta40 and 42 adopt distinct conformations in water: a combined MD / NMR study. J. Mol. Biol. *368*, 1448–1457.

Shankar, G.M., Bloodgood, B.L., Townsend, M., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., and Sabatini, B.L. (2007). Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid- β Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA-Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway. J. Neurosci. 27.

Shigetomi, E., Tong, X., Kwan, K.Y., Corey, D.P., and Khakh, B.S. (2011). TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. Nat. Neurosci. *15*, 70–80.

Shigetomi, E., Tong, X., Kwan, K.Y., Corey, D.P., and Khakh, B.S. (2012a). TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. Nat. Neurosci. *15*, 70–80.

Shigetomi, E., Tong, X., Kwan, K.Y., Corey, D.P., and Khakh, B.S. (2012b). TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. Nat. Neurosci. *15*, 70–80.

Shigetomi, E., Jackson-Weaver, O., Huckstepp, R.T., O'Dell, T.J., and Khakh, B.S. (2013a). TRPA1 Channels Are Regulators of Astrocyte Basal Calcium Levels and Long-Term Potentiation via Constitutive D-Serine Release. J. Neurosci. *33*, 10143–10153.

Shigetomi, E., Bushong, E.A., Haustein, M.D., Tong, X., Jackson-Weaver, O., Kracun, S., Xu, J., Sofroniew, M. V, Ellisman, M.H., and Khakh, B.S. (2013b). Imaging calcium microdomains within entire astrocyte territories and endfeet with GCaMPs expressed using adeno-associated viruses. J. Gen. Physiol. *141*, 633–647.

Shrivastava, A.N., Kowalewski, J.M., Renner, M., Bousset, L., Koulakoff, A., Melki, R., Giaume, C., and Triller, A. (2013). ??-amyloid and ATP-induced diffusional trapping of astrocyte and neuronal metabotropic glutamate type-5 receptors. Glia *61*, 1673–1686.

Simard, M., and Nedergaard, M. (2004). The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. Neuroscience *129*, 877–896.

Simpson, J.E., Ince, P.G., Lace, G., Forster, G., Shaw, P.J., Matthews, F., Savva, G., Brayne, C., and Wharton, S.B. (2010). Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. Neurobiol. Aging *31*, 578–590.

Šišková, Z., Justus, D., Kaneko, H., Friedrichs, D., Henneberg, N., Beutel, T., Pitsch, J., Schoch, S., Becker, A., vonderKammer, H., et al. (2014). Dendritic structural degeneration is functionally linked to cellular hyperexcitability in a mouse model of alzheimer's disease. Neuron *84*, 1023–1033.

Smith, I.F., Hitt, B., Green, K.N., Oddo, S., and LaFerla, F.M. (2005). Enhanced caffeineinduced Ca2+ release in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. J. Neurochem. 94, 1711–1718.

Sosunov, A.A., Wu, X., Tsankova, N.M., Guilfoyle, E., Ii, G.M.M., and Goldman, J.E. (2014). Phenotypic Heterogeneity and Plasticity of Isocortical and Hippocampal Astrocytes in the Human Brain. *34*, 2285–2298.

Srinivasan, R., Huang, B.S., Venugopal, S., Johnston, A.D., Chai, H., Zeng, H., Golshani, P., and Khakh, B.S. (2015). Ca(2+) signaling in astrocytes from Ip3r2(-/-) mice in brain slices and during startle responses in vivo. Nat. Neurosci. *18*, 708–717.

Steiner, H., Winkler, E., Edbauer, D., Prokop, S., Basset, G., Yamasaki, A., Kostka, M., and Haass, C. (2002). PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. J. Biol. Chem. *277*, 39062–39065.

Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., et al. (2003). ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures. Cell *112*, 819–829.

De Strooper, B., and Karran, E. (2016). The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. Cell *164*, 603–615.

Sun, W., McConnell, E., Pare, J.-F., Xu, Q., Chen, M., Peng, W., Lovatt, D., Han, X., Smith, Y., Nedergaard, M., et al. (2013). Glutamate-dependent neuroglial calcium signaling differs between young and adult brain. Science *339*, 197–200.

Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R., and Brunger, A.T. (1998). Crystal structure of a

SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 A resolution. Nature 395, 347–353.

Т

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.

Talantova, M., Sanz-Blasco, S., Zhang, X., Xia, P., Akhtar, M.W., Okamoto, S., Dziewczapolski, G., Nakamura, T., Cao, G., Pratt, A.E., et al. (2013). Aβ induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, E2518-27.

Tanaka, M., Shih, P., Gomi, H., Yoshida, T., Nakai, J., Ando, R., Furuichi, T., Mikoshiba, K., Semyanov, A., and Itohara, S. (2013). Astrocytic Ca2+ signals are required for the functional integrity of tripartite synapses. Mol. Brain *6*, 6.

Theis, M., and Giaume, C. (2012). Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity. Brain Res. *1487*, 88–98.

Thomas, D., Tovey, S.C., Collins, T.J., Bootman, M.D., Berridge, M.J., and Lipp, P. (2000). A comparison of fluorescent Ca2+ indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca2+ signals. Cell Calcium *28*, 213–223.

Toescu, E.C., Verkhratsky, A., and Landfield, P.W. (2004). Ca2+ regulation and gene expression in normal brain aging. Trends Neurosci. 27, 614–620.

Tong, X., Ao, Y., Faas, G.C., Nwaobi, S.E., Xu, J., Haustein, 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.

Tramutola, A., Lanzillotta, C., Perluigi, M., and Butterfield, D.A. (2016). Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. Brain Res. Bull.

Tsacopoulos, M., and Magistretti, P.J. (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. J. Neurosci. *16*, 877–885.

Tsai, G., Ralph-Williams, R.J., Martina, M., Bergeron, R., Berger-Sweeney, J., Dunham, K.S., Jiang, Z., Caine, S.B., and Coyle, J.T. (2004). Gene knockout of glycine transporter 1: characterization of the behavioral phenotype. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 8485–8490.

Tzingounis, A. V., and Wadiche, J.I. (2007). Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. Nat. Rev. Neurosci. *8*, 935–947.

U

Ujita, S., Sasaki, T., Asada, A., Funayama, K., Gao, M., Mikoshiba, K., Matsuki, N., and Ikegaya, Y. (2016). cAMP-Dependent Calcium Oscillations of Astrocytes: An Implication for Pathology. Cereb. Cortex bhv310-.

Unichenko, P., Myakhar, O., and Kirischuk, S. (2012). Intracellular Na+ concentration influences short-term plasticity of glutamate transporter-mediated currents in neocortical astrocytes. Glia *60*, 605–614.

V

Vandenberg, R.J., Ryan, R.M., Abrahamsen, B., Schneider, N., Erichsen, M., Huynh, T., Fahlke, C., Bunch, L., Jensen, A., Allen, N., et al. (2013). Mechanisms of glutamate transport. Physiol. Rev. *93*, 1621–1657.

Vardjan, N., and Zorec, R. (2015). Excitable Astrocytes: Ca2+- and cAMP-Regulated Exocytosis. Neurochem. Res. 40, 2414–2424.

Vardjan, N., Kreft, M., and Zorec, R. (2014). Dynamics of β -adrenergic/cAMP signaling and morphological changes in cultured astrocytes. Glia *62*, 566–579.

Velez-Fort, M., Audinat, E., and Angulo, M.C. (2012). Central Role of GABA in Neuron-Glia Interactions. Neurosci. *18*, 237–250.

Venance, L., Piomelli, D., Glowinski, J., and Glaume, C. (1995). Inhibition by anandamide of gap junctions and intercellular calcium signalling in striatal astrocytes. Nature *376*, 590–594.

Ventura, R., and Harris, K.M. (1999). Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. J. Neurosci. *19*, 6897–6906.

Verkhratsky, A., and Burnstock, G. (2014). Biology of purinergic signalling: Its ancient evolutionary roots, its omnipresence and its multiple functional significance. BioEssays *36*, 697–705.

Verkhratsky, A., and Butt, A.M. (2013). Glial physiology and pathophysiology: a handbook.

Verkhratsky, A., and Parpura, V. (2014). Store-operated calcium entry in neuroglia. Neurosci. Bull. *30*, 125–133.

Verkhratsky, A., and Toescu, E.C. (1998). Calcium and neuronal ageing. Trends Neurosci. 21, 2–7.

Verkhratsky, a, and Steinhäuser, C. (2000). Ion channels in glial cells. Brain Res. Brain Res. Rev. 32, 380–412.

Verkhratsky, A., Reyes, R.C., and Parpura, V. (2014). TRP channels coordinate ion signalling in astroglia. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. *166*, 1–22.

Verkhratsky, A., Rodríguez-Arellano, J.J., Parpura, V., and Zorec, R. (2016a). Astroglial calcium signalling in Alzheimer's disease. Biochem. Biophys. Res. Commun.

Verkhratsky, A., Zorec, R., Rodríguez, J.J., and Parpura, V. (2016b). Astroglia dynamics in ageing and Alzheimer's disease. Curr. Opin. Pharmacol. *26*, 74–79.

Verkhratsky, A., Zorec, R., Rodriguez, J.J., and Parpura, V. (2016c). PATHOBIOLOGY OF NEURODEGENERATION: THE ROLE FOR ASTROGLIA. Opera Medica Physiol. *1*, 13–22.

Villalba, R.M., and Smith, Y. (2013). Differential striatal spine pathology in Parkinson's disease and cocaine addiction: A key role of dopamine? Neuroscience 251, 2–20.

Virchow, R. (1858) Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische and pathologische Gewebelehre. Zwanzig Vorlesungen gehalten während der Monate Februar, März und April 1858 im pathologischen Institut zu Berlin, August Hirschwald

Volterra, A., and Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. Nat. Rev. Neurosci. *6*, 626–640.

Volterra, A., Liaudet, N., and Savtchouk, I. (2014). Astrocyte Ca(2+) signalling: an unexpected complexity. Nat. Rev. Neurosci. 15, 327–335.

W

Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V, Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. Nature *416*, 535–539.

Walz, W. (2000). Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. Neurochem. Int. *36*, 291–300.

Wang, X.F., and Cynader, M.S. (2002). Astrocytes Provide Cysteine to Neurons by Releasing Glutathione. J. Neurochem. *74*, 1434–1442.

Wang, H.Y., Lee, D.H., D'Andrea, M.R., Peterson, P.A., Shank, R.P., and Reitz, A.B. (2000a). beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. J. Biol. Chem. *275*, 5626–5632.

Wang, J., Dickson, D.W., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1999). The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. Exp. Neurol. *158*, 328–337.

Wang, Z., Haydon, P.G., and Yeung, E.S. (2000b). Direct observation of calcium-independent intercellular ATP signaling in astrocytes. Anal. Chem. *72*, 2001–2007.

Watkins, J.C., and Evans, R.H. (1981). Excitatory Amino Acid Transmitters. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 21, 165–204.

Weissman, T.A., Riquelme, P.A., Ivic, L., Flint, A.C., and Kriegstein, A.R. (2004). Calcium Waves Propagate through Radial Glial Cells and Modulate Proliferation in the Developing Neocortex. Neuron *43*, 647–661.

Wilcock, D.M., Vitek, M.P., and Colton, C.A. (2009). Vascular amyloid alters astrocytic water and potassium channels in mouse models and humans with Alzheimer's disease. Neuroscience *159*, 1055–1069.

Witcher, M.R., Kirov, S.A., and Harris, K.M. (2007). Plasticity of perisynaptic astroglia during synaptogenesis in the mature rat hippocampus. Glia 55, 13–23.

Wolfe, M.S., Selkoe, D.J., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., and Kimberly, W.T. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and [[gamma]]-secretase activity. Nature *398*, 513–517.

Woo, D.H., Han, K.-S., Shim, J.W., Yoon, B.-E., Kim, E., Bae, J.Y., Oh, S.-J., Hwang, E.M., Marmorstein, A.D., Bae, Y.C., et al. (2012). TREK-1 and Best1 Channels Mediate Fast and Slow Glutamate Release in Astrocytes upon GPCR Activation. Cell *151*, 25–40.

Wyss-Coray, T., Loike, J.D., Brionne, T.C., Lu, E., Anankov, R., Yan, F., Silverstein, S.C., and Husemann, J. (2003). Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. Nat. Med. *9*, 453–457.

X, Y, Z

X Tong, E Shigetomi, LL Looger, and BS Khakh (2013). Genetically encoded calcium indicators and astrocyte calcium microdomains. *4*.

Xie, L., Kang, H., Xu, Q., Chen, M.J., Liao, Y., Thiyagarajan, M., O'Donnell, J., Christensen, D.J., Nicholson, C., Iliff, J.J., et al. (2013). Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. Science *342*, 373–377.

Xu JH, Long L, Tang YC, Hu HT, and T.F. (2007). Cav1.2, Cav1.3, and Cav2.1 in the Mouse Hippocampus During and After Pilocarpine-Induced Status Epilepticus. Hippocampus *17*, 235–251.

Yeh, C.-Y., Vadhwana, B., Verkhratsky, A., and Rodríguez, J.J. (2011). Early astrocytic atrophy in the entorhinal cortex of a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. ASN Neuro *3*, 271–279.

Yi, C., Mei, X., Ezan, P., Mato, S., Matias, I., Giaume, C., and Koulakoff, A. (2016). Astroglial connexin43 contributes to neuronal suffering in a mouse model of Alzheimer's disease. Cell Death Differ. 1–11.

Younkin, S.G. (1998). The role of A??42 in Alzheimer's disease. In Journal of Physiology Paris, pp. 289–292.

Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y.Q., Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T., et al. (2000). Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. Nature *407*, 48–54.

Zafra, F., Aragón, C., Olivares, L., Danbolt, N.C., Giménez, C., and Storm-Mathisen, J. (1995). Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. J. Neurosci. *15*, 3952–3969.

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.


7.1. Publication scientifique (Glia 2015)

RESEARCH ARTICLE -

Disruption of Dopaminergic Transmission Remodels Tripartite Synapse Morphology and Astrocytic Calcium Activity Within Substantia Nigra Pars Reticulata

Anthony Bosson,^{1,2} Sylvie Boisseau,^{1,2} Alain Buisson,^{1,2} Marc Savasta,^{1,2} and Mireille Albrieux^{1,2}

The substantia nigra pars reticulata (SNr) is a major output nucleus of the basal ganglia circuitry particularly sensitive to pathological dopamine depletion. Indeed, hyperactivity of SNr neurons is known to be responsible for some motor disorders characteristic of Parkinson's disease. The neuronal processing of basal ganglia dysfunction is well understood but, paradoxically, the role of astrocytes in the regulation of SNr activity has rarely been considered. We thus investigated the influence of the disruption of dopaminergic transmission on plastic changes at tripartite glutamatergic synapses in the rat SNr and on astocyte calcium activity. In 6-hydroxydopamine-lesioned rats, we observed structural plastic changes of tripartite glutamatergic synapses and perisynaptic astrocytic processes. These findings suggest that subthalamonigral synapses undergo morphological changes that accompany the pathophysiological processes of Parkinson's disease. The pharmacological blockade of dopaminergic transmission (with sulpride and SCH-23390) increased astrocyte calcium excitability, synchrony and gap junction coupling within the SNr, suggesting a functional adaptation of astrocytes to dopamine transmission disruption in this output nucleus. This hyperactivity is partly reversed by subthalamic nucleus high-frequency stimulation which has emerged as an efficient symptomatic treatment for Parkinson's disease. Therefore, our results demonstrate structural and functional reshaping of neuronal and glial elements highlighting a functional plasticity of neuroglial interactions when dopamine transmission is disrupted.

Key words: Parkinson, DBS, astrocyte, calcium, synchrony, dopamine

GUA 2015;63:673-683

Introduction

Dopamine (DA) is a key neurotransmirrer, expressed in restricted brain areas, whose deficiency leads to complex physiological changes associated with motor and cognitive disorders (Nieoullon and Coquerel, 2003). The basil ganglia circuitry is massively innervated by the mesencephalic dopaminergic system and is the first line affected by this deficiency. According to the classical pathophysiological model of Parkinson's disease (Albin et al., 1989; DeLong, 1990), the degeneration of dopaminergic nigrostriatal neurons generates hyperactivity of the glutamatergic neurons of the subthalamic nucleus (STN). This leads to an increase in the ronic discharge of the main basal ganglia output nucleus innervated by STN, the substantia nigra pars reticulata (SN0, thereby responsible for an inability to initiate or to suppress movements (Chevalier and Deniau, 1990; Hikosaka, 2007). Highfrequency stimulation of the STN (STN-HFS) is currently the main surgical treatment for advanced Parkinson's disease particularly restoring SNr neuronal activity. STN-HFS may exert these effects by activating the axons of STN neurons or external globus pallidus (GPe) fibers passing close to the site of stimulation, leading to the release of both glutamate and

View this article online at wileyonlinelibrary.com. DOI: 10.1002/glia.22777

Published online December 15, 2014 in Wiley Online Library (wileyonline)/brany.com). Received May 16, 2014, Accepted for publication Dec 1, 2014

Address correspondence to Mitelile Albrieux, Insern UB36, Univ. Grenoble Albre, Grenoble Institut des Neurosciences, 38000 Grenoble, France. E-mail: mitelile albrieux@ujf-grenoble.fr

From the ¹inserm, U836, 38000, Grenoble, France, ²Univ. Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences, 38000, Grenoble, France.

Anthony Bosson and Sylvie Bosseau contributed equally to this work:

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

© 2014 Wiley Periodicals, Inc. 673

GABA within the SNr and thus modulating the excitatory/ inhibitory balance inherent to this basal ganglia output structure (Bosch et al., 2011; Maurice et al., 2003; Windels et al., 2005).

The neuronal network and signal processing involved in basal ganglia dysfunction are well known but, paradoxically, the role of astrocytes in the regulation of SNr activity has rarely been studied. Astrocyte calcium excitability is known to be involved in exchanging information with synaptic elements, modulating neuronal excitability (Fiacco and McCanhy, 2004, 2006; Parri et al., 2001). Conversely, neurotransmitters such as glutamate or GABA activate receptors on astrocytes generating calcium transients that propagate within the astrocyte population (Haydon, 2001; Porter and McCarthy, 1996). Indeed, astrocytes are dynamic brain elements that sense neuronal inputs by their ion channels, neurotransmitter receptors and transporters, and can respond by complex calcium signaling and/or morphological plasticity to modulate pre- and postsynaptic elements (Perea et al., 2009) in physiological or pathological states, leading to the concept of tripartite synapse (Araque et al., 1999). Thus, juxtaposition of astrocytic membranes with presynaptic and postsynaptic elements is important for regulating synaptic transmission and plasticity (Haber et al., 2006).

We have previously shown that, in physiological conditions, SNr astrocytes display spontaneous calcium activity modulated by STN-HFS in a gluramate and GABA releasedependent manner (Barat et al., 2012). In this work, we investigated the impact of DA transmission disruption on structural and functional plasticity of SNr astrocytes. We found that neuronal and astrocytic elements at glutamatergic synapses underwent significant plastic changes in the SNr of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned rats. In parallel, DA transmission disruption led to remodeling of the individual astrocytic calcium activity and of their global network activity. Interestingly, STN-HFS partially reversed this remodeling of astrocyte activity. Together, these results demonstrate that both neuronal and astrocytic components are involved in adaptation to pathophysiological processes affecting dopaminergic systems,

Materials and Methods

Unilaterally 6-Hydroxydopamine-Lesioned Rats

Animal experimentation was carried out in accordance with the European Community Conncil directives of November 24, 1986 (86/609/EEC) and with the French guidelines on the use of living animals in scientific investigations with the approval of the "Grenoble Institute of Neurosciences Ethical Committee". Sprague-Dawley tast weighing 250 g were anesthetized with ketamine/xylazine (7.5 mg/kg, i.p., Sigma-Aklrich) and secured in a Kopf sereetasic apparatus (Phymep, Paris, France). After treatment with

674

desipramine (20 mg/kg, s.c., Sigma-Aldrich) to protect noradrenergic neurons, animals received an injection, into the right substantia nigra pars compacta (SNe), of 9 µg 6-bydroxydopamine (6-OHDA, Sigma-Aldrich) dissolved in 3 µL sterile 0,9% NaCl and 0.2% ascorbic acid at a flow rate of 0.5 µL/min [coordinates relative to bregma: -5.3 mm anteroposterior, 2.35 mm lateral, and -7.5 mm dorsoventral, with the incisor bar 3.2 mm below the interaural plane (Paxinos and Watson, 1982)]. After 3 weeks, 6-OHDA-lesioned and control animals of the same age (6 weeks old) were anesthetized with chloral hydrate (0.5 mL/100 g) and perfused intracardially with 200 mL 0.9% NaCl followed by 300 mL 4% paraformaldehyde in 0.1M PBS, pH 7.3. Brains were rapidly removed, postfixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde, immensed in 20% sucrose in 0.1M PBS, pH 7.5, frozen in cooled (-40°C) isopentane and stored at -30°C. Serial frontal sections (30 µm thick) were cut with a cryostat microtome (HM 500M, Microm, Francheville, France).

Immunohistochemistry

Floating sections were washed in TBS buffer (0.1M Tris base, 0.15M NaCl) and blocked by incubation with 3% bovine senan abumin in TBS-Tween-Triton (TBSTT) (0.1M Tris Base, 0.15M NaCl, 0.1% Tween, 0.1% Triton X-100) for 30 min (dilution/blocking buffer). Tissue sections were then incubated overnight at 4°C with the following antibodies: antityrosine hydroxylase (TH: Chemicon, Temecula, USA, mouse monoclonal, 1:1000), antiglial fibrillary acidic protein (GFAP; Dako, Glostrup Denmark, rabbit polyclonal, 1:1000), antiphosphoezrin/radikin/moesin (Cell Signaling, Danvers, USA, rabbit polyclonal, 1:500), anti-PSD95 (Synaptic System, Gottingen, Germany, mouse monoclonal, 1:100), antisynaptophysin (Synaptic System, guinea pig monoclonal, 1:500) and anticonnexin 43 (Cx43; Invirtogen, rabbit polyclonal, 1:500). Tissue sections were washed in TBSTT and incubated for 2 h at room temperature with the appropriate Alexa Fluor 488-conjugated, Alexa Fluor 649conjugated (Molecular Probes) or cyanin 3-conjugated (Jackson ImmunoResearch Laboratories) secondary antibody (1:1000), Sections were washed in TBSTT and mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories).

Image Acquisition and Quantitative Analysis

Sections were examined with a Zeiss LSM 710 contocal laser scanning microscope with an oil immersion Plan Apochromat $100\times$ objective (NA 1.4). Images stacks (n = 20, 300 nm focal steps) were acquired for each channel separately with a translating platform with motorized crossed roller stages and "Zen" software, in a 12-bit format.

Images were then deconvolved using MeraMorph (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) with an iterative deconvolution based on calculated point spread function (PSF) applying the method of calibrating fluorescent bcads (175 nm; Molecular Probes) (Lavialle et al., 2011). For each immunostaining, maximum projections of 20 consecutive deconvolved z slices were processed in ImageJ (Preibisch et al., 2009). Quantitative analysis of each immunostaining was based on area measurement after binarization, for each 1140 µm² field, To quantify astrocyte-synapse comacts, the three deconvolved and z-projected images were merged and each area of colocalization

was defined as an object, counted with the "cell counter" plug-in and measured with "analyze particles" measure function and "ROI manager" in ImageJ.

The proportion of triple stained dots was estimated in relation to the double PSD95-synaptophysin stained dots in the projected merged images, with the "cell counter" plug-in, Adobe Photoshop CS was used for ultimate image processing (brightness and contrast adjustments) and merging.

The results are presented as means \pm SEM. Statistical analyses were carried out with Mann-Whitney–Wilcoxon tests with significance levels of "P < 0.05; ""P < 0.01, and """P < 0.001.

Calcium Imaging on Brain Slices

Sagittal slices containing the rostral midbrain (350 µm thick) were prepared from Sprague-Dawley rats (postnatal days 17-21; Janvier, Le Genest St Isle, France) as previously described (Barat et al., 2012). Slices containing the GPe, the STN and the SNr were loaded with the calcium indicator dye Fluo-4 by immersion for 45 min at 35°C in a bath containing 5 µM Fluo-4 AM (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), 0.01% Plutonic acid F-127 (Molecular Probes), 0.005% Cremophor EI. (Sigma-Aldrich), and 0.05% DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich) in antificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing in mM: 125 NaCl, 2.3 KCl, 1.2 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 26 NaHCO₃, and 10 glucose. As previously shown, these conditions allowed us to load around 98% of SNr astrocytes (Barat et al., 2012). After recovery, slices were placed in a constantly perfused chamber on the stage of an upright compound microscope (Eclipse E600 FN, Nikon, Paris, France) equipped with a water immersion 20× objective and a confocal head (confocal CI head, Nikon, Paris, France). Excitation was achieved with light at 488 nm and emission was filtered with a 515 ± 15 nm filter. Images were acquired with EZ-C1 software (Nikon, Paris, France) at 1.2 s intervals in a single confocal plane over a period of 5 min.

DA transmission was pharmacologically blocked by incubating slices with 1 μ M SCH-23390 (D1 receptor antagonist: Sigma-Aldrich) and 10 μ M sulpiride (D2/D3 receptor antagonist: Sigma-Aldrich) for 1 h before and during cakium imaging recording (Aceves et al., 2011; Ibanez-Sandoval et al., 2006). Pharmacological inhibitors, such as tetrodotoxin (TTX; Latoxan, Vakuce, France) or carbenosolone (Sigma-Aldrich) were perfused in the bath 5 and 20 min before recording, respectively.

When required, brain slices were fixed 1 h at room temperature in 4% paraformaklehyde, then immunostained as described above.

Electrical Stimulation Procedure

A concentric bipolar stimulation electrode (platinum/indium; Frederick Haer & Co., USA) was positioned in the middle of the STN within the brain slice, The electrical stimulation consisted of multiple rectangular pulses (0.1 ms duration; 100 Hz) of constant current (200 μ A) applied during the 5 min recording period (Barat et al., 2012).

Quantification and Statistical Analysis

CalSignal software detected cells and measured their intracellular Ca²⁺ activity, analyzing the fluorescence signal F within each region

April 2015

Bosson et al.: SNr Astrocyte Adaptation to Parkinsonian State

of interest (Barat et al., 2012; Platel et al., 2007). Single movies included 59 \pm 22 astrocytes on a field of view of 600 \times 300 µm², Significant changes in fluorescence were detected on the basis of the calculated ΔFF_0 ratios and their amplitude and duration were determined. These data were exported to SignaStat software (Systat) for statistical analysis. All results are presented as means \pm SEM. Statistical analyses were carried out with Mann-Whitney–Wikcoxon tests with significance levels of *P < 0.05; **P < 0.01, and ***P < 0.001.

We performed emissionrelation analysis to estimate the synchrony between cells. This crosscorrelation function was computed between the calcium traces of two astrocytes and adopted as a measure of similarity between the waveforms. The crosscorrelations between the calcium signals of couples of cells were calculated at time lags of -1.2 and +1.2 s using the "correct" function of Matlab. The cell couples were considered as synchronous when the crosscorrelation coefficient esceeded 0.7 and their temporal patterns of fluorescence were similar (Savaki et al., 2011).

Electrophysiological Recordings and Biocytin Diffusion

Sagittal slices were observed with a water immersion 60× (NA 1.0) objective and an infrared-differential interference contrast microscopy with CCD camera (Optronis VX45, Kehl, Germany). Cells were identified as astrocytes based on morphological criteria and on electrophysiological properties. Glass pipettes (8-11 MΩ) were filled with intracellular solution containing, in mM: 105 K-gluconate, 30 KCI, 10 phosphocnearine, 10 Hepes, 4 ATP-Mg, 0.3 GTP-Tris, 0.3 EGTA, adjusted to pH 7.2 with KOH. Biocytin (5 mg/mL; Sigma-Aldrich) was added to the pipette solution before each experiment. Signals were amplified by Asoparch 200B, sampled by a Digidata 1440A interface and recorded with pClamp8 software (Molecular Devices, Foster City, USA). Input resistance was calculated by measuring current in response to a 10 mV pulse with 80 ms duration, near the end of the voltage command. Only passive astrocytes showing linear I/V relationship were kept for loading. Access resistance was monitored and cells were excluded from this study when this parameter varied >10% throughout the experiment. Cells were loaded passively with biocytin for 20 min in voltage-clamp mode. Slices were then fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4. Biocytin detection was performed by incubating slices in avidin-biotinylated horseradish peroxidase (ABC-Elite, Vector Laboratories, Burlingame, USA), reacting with 3.3-diaminobenzidine (Vector Laboratories). Images were acquired with a light microscope (Eclipse 80i, Nikon) coupled to the ICS Framework analysis system (TRIBVN, Paris, France). Quantification was carried out in a double-blind paradigm by counting the number of biocytin-stained cells with "cell counter" ImageJ plug-in.

Results

Structural Plasticity of Subthalamonigral Synapses in 6-OHDA-Lesioned Rats

We mimicked parkinsonian DA neuronal loss by a single stereoractic injection of 6-OHDA into the SNc (Ungerstedt, 1971). The efficacy of 6-OHDA lesion was assessed for each

675



FIGURE 1: Astrocyte processes morphology in 6-OHDA-lesioned rats. Immunofluorescence labeling of DA neurons (TH positive, green) in control (A) and 6-OHDA-lesioned (B) rats reveals the SNc lesion. Higher magnification of GFAP-immunoreactive astrocytes within the SNr (corresponding to the white rectangle area in A) shows little cytoplasm and thin processes in the control rat (C). Reactive GFAPpositive astrocytes with extensive cytoplasm and branched processes were found in the ipsilateral SNr (white rectangle area in B) of 6-OHDA-lesioned rat (D). Phosphoezrin was similarly distributed in control (E), and 6-OHDA-lesioned rats (F). Phosphoezrin punctates were mostly localized in distal astrocytic processes excluding GFAP staining. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

rat by immunostaining brain sections for TH (Fig. 1A,B). As previously described, partial lesion of the ascending dopamine pathway triggers activation of astrocytes in several regions of basal ganglia objectivized by the increase in GFAP immunoreactivity (Henning et al., 2008). In the SNr, the size of the somata and number of branched processes were increased in reactive astrocytes (Fig. 1C,D). Phosphoezrin is a membrane cytoskeleton linker expressed in astrocytic processes and involved in the formation of perisynaptic astrocyte processes contacting synapses (Lavialle et al., 2011). Phosphoezrin immunostaining appeared as discrete punctates continuous with GEAP-positive stem processes. In both control and lesioned animals, phosphoezrin punctates were similarly localized in distal astrocytic processes (Fig. 1E,F). We thus wondered about structural modifications of perhynaptic astrocytic processes at glutamatergic synapses within this output nucleus of the basal ganglia. Immunofluorescence was therefore used to stain synaptophysin (specific to presynaptic terminals), PSD95 (specific to glutamatergic postsynaptic dements), and phosphoezrin [specific to perisynaptic astrocyte processes (Lavialle et al., 2011)], Immunolabelings of these three dements displayed punctared labeling with frequent juxtaposition (Fig. 2). The area of each immunostained object was quantified and compared between control and lesioned animals (16 fields from 4 animals for each group). Overall, we observed an increase in PSD95 (18.9 \pm 2.2 versus 13.3 \pm 1.1

Bosson et al.: SNr Astrocyte Adaptation to Parkinsonian State



FIGURE 2: Structural plasticity of tripartite synapses in 6-OHDA-lesioned rats. Maximum projections of 20 consecutive 2 slices and subsequent deconvolution of synaptophysin (blue), PSD95 (green), and phosphoezrin (red) stainings in control (A) and 6-OHDA-lesioned (B) rat SNr sections. On merged images, PSD95 and synaptophysin appear in gray and phosphoezrin appears in red in order to illustrate the relocation of phosphoezrin staining close to synaptic elements in lesioned rats. (C) Synapses were objectivized by juxtaposition of PSD and synaptophysin-positive elements (white arrows). In order to analyze tripartite synapses number and perisynaptic ezrin area, only phosphoezrin-positive puncta associated with a pre-and a postsynaptic juxtaposed element were measured (lower panels, white objects). (D) Quantitative analysis of the number of total and tripartite synapses with SNr and of perisynaptic phosphoezrin area around individual synapse in control (light gray) and 6-OHDA-lesioned (dark gray) rats. Quantitative analysis was done on 1140 µm² fields. Results are compared with the control condition with *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

 μm^2 per field in control; P = 0.048) and synaptophysin (30.6 ± 1.8 versus 21.5 ± 1.6 μm^2 per field in control; P = 0.027) staining areas in 6-OHDA-lesioned animals (Fig. 2A.B). Advanced analysis of juxtaposed zones containing PSD95 and synaptophysin stainings provided an estimation of individual synapses within SNr (Fig. 2C) and showed an increase of the number of excitatory synapses in 6-OHDAlesioned animals (55.5 \pm 3.9 versus 40.6 \pm 3.8 synapses per field in control; P = 0.02). Analysis of phosphoezrin staining surrounding these synapses (Fig. 2C) revealed that the number of mipartite synapses also significantly increased in 6-OHDA-lesioned animals (42.4 \pm 4.0 versus 28.7 \pm 3.2

April 2015

677.

tripartite synapses per field in control; P = 0.012; Fig. 2D) even if the proportion of tripartite synapses remained the same (75.2 \pm 3.5% versus 70.2 \pm 4.1% in control; P = 0.37). Interestingly, the area of phosphoezrin surrounding synapses trended towards being larger (16.4 \pm 2.8 versus 8.7 \pm 1.5 μ m² in control; P = 0.052; Fig. 2D). As there was no increase in the overall phosphoezrin area stained (15.4 \pm 1.9 versus 15.8 \pm 2.2 μ m² per field in control; P = 0.969) in 6-OHDA animals, this indicated relocalization and reshaping of perisynaptic astrocyte processes within SNr in lesioned animals.

Blockade of DA Transmission Increases Astrocytic Calcium Activity Within SNr

Asmocynic coverage of synapses has already been reported to be correlated with calcium signaling changes within astrocytes (Tanaka et al., 2013). To analyze the consequences of DA transmission blockade on astrocytic spontaneous calcium activity, we incubated acute brain slices with 1 µM SCH-23390 (D1 receptor antagonist) and 10 µM sulpiride (D2/ D3 receptors antagonist). We prior checked the effect of this pharmacological blockade on tripartite synapse plasticity, using the same methodological approach than described above (n = 16 fields from 4 slices for each condition), One-hour DA transmission blocking induced an increase of GFAP immunoreactivity (Supp. Info. Fig. 1) with no obvious change in phosphoezrin localization. Overall PSD95, synaptophysin and phosphoezrin staining areas were similar in physiological condition and under blockade of DA transmission. This was not accompanied either by an increase of the total number of synapses nor with the number of tripartite synapses within SNr (Supp. Info. Fig. 1). The perisynaptic phosphoezrin surface around tripartite synapses was also similar (9.7 ± 3.5 µm² versus 7.5 ± 1.6 µm² in physiological condition; P = 0.15; n = 4). In order to assess the early effect of DA transmission disruption on the astrocytic network, we next analyzed calcium signaling within SNr astrocytes.

In our Fluo-4 loading condition, only astrocytes were loaded (Barat et al., 2012). Blockade of DA mansmission (Fig. 3A–C) had no significant effect on the proportion of active astrocytes (23.9 ± 1.7% versus 31.5 ± 2.5% in physiological condition during a 5 min recording period, n = 48 dices from 38 animals and 50 slices from 27 animals, respectively; P = 0.074). However, we observed a change in the temporal dynamics of calcium signaling within active astrocytes since blockade of DA transmission increased the frequency (0.51 ± 0.01 min⁻¹ versus 0.37 ± 0.07 min⁻¹ in physiological condition: P < 0.001), amplitude [0.36 ± 0.01 versus 0.19 ± 0.07 (ΔFF_0 , arbitrary units); P < 0.001], duration (32.3 ± 0.9 s versus 23.5 ± 8.8 s; P < 0.001) and the area under the curve [6.2 ± 0.2 versus 3.5 ± 1.5 (arbitrary units); P < 0.001]. Thus, blockade of DA transmission induced a global increase in the calcium dynamics

678

of SNr active astrocytes without affecting the proportion of spontaneously active astrocytes.

In physiological conditions, about half of the spontaneous activity of SNr astrocytic is autonomous (i.e., independent of neuronal activity), the other half being dependent on the spontaneous release of glutamate and GABA under the control of the STN-SNt and GPe-SNr pathways (Bant et al., 2012). We investigated the effect of DA transmission blockade on the autonomous and neuronal activity-dependent part of spontaneous activity by blocking neuronal transmission with 500 nM tetrodotoxin (TTX). We observed a substantial decrease in the proportion of active astrocytes $(7.6 \pm 1.0\%$ of remaining active astrocytes; n = 17 dices from 12 animals; P < 0.001; Fig. 3C) corresponding to the neuronal activity-dependent part of the SNr astrocytic activity. Interestingly, within the remaining active astrocytes (i.e., autonomously active), TTX had no effect on the increase in calcium signals parameters triggered by the blockade of DA transmission (frequency: 0.49 ± 0.01 min⁻¹; amplitude: $0.39 \pm 0.04 \ \Delta FF_0$; duration: 30.1 ± 3.0 s; area under the curve: 7.1 ± 1.0 arbitrary units) suggesting that DA transmission blockade exerts a direct influence on the dynamics of the astrocytic autonomous activity,

Interruption of DA Transmission Increases Synchrony and Gap Junction Coupling Within SNr Astrocyte Network

Astrocytes are interconnected via gap junctions, which allow intercellular trafficking and tend to synchronize cell populations (Theis and Giaume, 2012). To investigate this communication in the SNr under interruption of DA transmission, we developed a crosscorrelation function between calcium traces for each couple of active astrocytes (Fig. 3E). Positive synchrony was then restricted to cells whose temporal patterns of fluorescence were the same throughout the period of recording (Fig. 3E, right panel). We found that synchrony increased when DA transmission was disrupted (8.0 ± 1.2 versus 3.3 ± 1.8% in physiological condition; n = 48 slices; P = 0.048; Fig. 3F). Concurrently, we assessed gap junction connections within SNr by analyzing the diffusion of a gap-junction channel-permeable tracer, biocytin, dialyzed by whole-cell recording of an astrocyte. Dialysis for 20 min resulted in extensive intercellular diffusion of biocytin into neighboring astrocytes (219 \pm 29 cells; n = 5slices Fig. 4B.C). This coupled network was significantly more extended than in physiological condition (119 \pm 21 cells; n = 5slices, P = 0.032) with an increase in the density of coupled astrocytes (158 ± 14 astrocytes/mm² versus 87 ± 17 astrocytes/ mm^2 in physiological condition; P = 0.032). Within passive astrocytes, input resistance slightly decreased, although not significandy, when DA transmission was blocked (42.9 ± 12.7 MΩ versus 67.1 ± 18.5 MΩ in physiological condition; n = 7

Bosson et al.: SNr Astrocyte Adaptation to Parkinsonian State



FIGURE 3: Effect of acute interruption of DA transmission on SNr astrocyte calcium activity. (A) Fluo-4-loaded cells in the SNr area of a rat sagittal slice; each white dot is an astrocyte. (B) Example of typical fluorescence variations recorded in SNr astrocytes in physiological conditions (gray, Physio) and during DA transmission blockade (green, InhD1D2). (C) Proportion of SNr astrocytes displaying calcium activity during DA transmission blockade (InhD1D2), when 500 nM TTX, 100 µM CBX and STN-HFS were applied and in physiological conditions (Physio). (D) Frequency and amplitude of astrocyte calcium activity during DA transmission blockade (InhD1D2), when 500 nM TTX, 100 µM CBX, and STN-HFS were applied and in physiological conditions (Physio). (D) Frequency and amplitude of astrocyte calcium activity during DA transmission blockade (InhD1D2), when 500 nM TTX, 100 µM CBX, and STN-HFS were applied and in physiological conditions (Physio). (E) Example of a securic conditions (Physio). (E) Example of a pseudo-colored trosscorrelation matrix. The false color encoded the crosscorrelation coefficient computed between the calcium traces of two astrocytes. The two profiles on the right illustrate synchronous activities within two distant astrocytes. (F) Effect of 500 nM TTX, 100 µM CBX, and STN-HFS on SNr astrocyte activity synchrony during DA transmission blockade (InhD1D2) and in physiological conditions (Physio). Results are always compared with InhD1D2 condition with *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

and 9, respectively; P = 0.351). As previously reported, this electrophysiological parameter seems to be less robust than dye diffusion to reflect the syncytium size (Schools et al., 2006). Concurrently, we looked at the expression pattern of astrocytic junctional protein connexin 43 (Cx43) and found an enrichment of its distribution in SNr when DA transmission was disrupted (Fig. 4D). Together, these findings suggest an increase in coupling between neighboring astrocytes when DA transmission is blocked.

We next analyzed the effect of carbenoxolone (CBX, a gap-junction blocker) on astrocyte hyperexcitability. 100 μ M CBX applied for 20 min had no effect either on the propor-

tion of active astrocytes $(19.3 \pm 3.1\%; n=9$ slices from 5 animals, P=0.233) or on calcium signal parameters whereas it almost eliminated synchrony between astrocytes $(0.8 \pm 0.5\%; n=9$ slices; P=0.001; Fig. 3C, D, F). Finally, we explored the involvement of neuronal activity in this synchronization, analyzing the effect of TTX. Synchrony was greatly decreased by TTX treatment $(0.32 \pm 0.21\%$ synchronous astrocytes; n=17 slices; P<0.001; Fig. 3F) suggesting that the correlated network properties are highly dependent on neuronal activity. This raised the question of the impact on astrocytes of functional restoration of SNr neuronal activity by STN-HFS.

April 2015

679



FIGURE 4: Effect of acute interruption of DA transmission on SNr astrocyte gap-junction coupling. (A) Example of passive whole-cell current recorded in SNr astrocytes (16/22 of recorded astrocytes were passive, 6/22 displayed an outward rectifying current, and 1/22 displayed a slowly decaying current; n = 22). Cell was held at -70 and 10 mV hyper- and depolarizing voltage steps of 80 ms duration were applied in both directions (-110 to +80 mV). (B) Example of functional coupling of astrocytes visualized by diffusion of biocytin dialyzed for 20 min by whole-cell recording of a passive SNr astrocyte in the physiological condition (left) and during DA transmission blockade (right). Images were obtained after fixation of the slice and peroxidase revelation of biocytin. (C) Graph summarizing the extent of SNr astrocyte coupling for biocytin during physiological (light gray) and DA transmission blockade (dark gray) conditions. (D) Immunofluorescence labeling of Cx43 (red) within SNr in physiological (left) and DA transmission blockade (right) conditions. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

STN-HFS Partly Regulates Astrocyte Hyperactivity

STN-HFS is known to restore activity of SNr neurons in parkinsonian state to normal by recruiting both glutamatergic axons from the STN and GABAergic passing fibers from the GPe (Bosch et al., 2011; Maurice et al., 2003). We previously showed that STN-HFS also affects SNr astrocyte excitability in physiological condition (Barat et al., 2012). We therefore investigated the effect of STN-HFS on astrocyte hyperactivity induced by the blockade of DA transmission (Fig. 3C.D). We applied bipolar electrical stimulation to the STN during a 5 min recording period. This stimulation led to a significant decrease in the proportion of active astrocytes (15.3 \pm 2.0% of active astrocytes; n = 22 dices from 16 animals; P = 0.005). Interestingly, STN-HFS also strongly disrupted astrocytic synchrony (0.73 ± 0.5% synchronous astrocytes; n = 23 slices; P < 0.001; Fig. 3F) confirming the involvement of neuronal transmission in astrocyte activity synchronization. However, no effect on the remporal dynamics of calcium signals was observed

680

(frequency: $0.46 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$; amplitude: $0.36 \pm 0.02 \Delta F/F_0$; duration: 34.0 ± 1.3 s area under the curve: 6.5 ± 0.8 arbitrary units): these contrinued to be significantly higher than in physiological conditions (P < 0.001 for each). Thus, STN-HPS partly reverses astrocytic hyperactivity by reducing the proportion of active cells and their synchronization. This treatment does not, however, counteract the remodeling of the temporal dynamics of calcium signaling triggered by the blockade of DA transmission,

Discussion

In this study, we showed that reducing or blocking DA transmission led to both structural and functional SNr astrocyte remodeling. Astrocytic elements at glutamatencic synapses underwent significant plastic changes suggesting a reorganization of tripartite synapses in the SNr when DA neurons of the SNc were lesioned. In parallel, when DA transmission was blocked, spontaneous calcium activity of individual

astrucytes and global network synchrony were enhanced. This astrucyte hyperactivity was pantially reversed by STN-HFS,

As the final stage of information processing within basal ganglia takes place in the SNr, this nucleus may be considered as a gateway in the transmission of basal ganglia information to the motor and cognitive systems (Deniau et al., 2007). We developed two complementary strategies to investigate the impact of hypodopaminergy on the astrocyte network, (i) chronic depletion of DA by 6-OHDA lesion and (ii) acute blockade of DA transmission in brain slices with a cocktail of D1- and D2-class receptor antagonists. We did not perform functional experiments on brain slices from lesioned rats since calcium imaging studies could not be carried out in animals over the age of 25 days. Pharmacological blockade of DA transmission on acute brain slice preparation is a good alternative, reproducing the enhancement of subthalamonigral and pallidonigral transmission (Aceves et al., 2011; Ibanez-Sandoval et al., 2006) and altering the tonic and regular mode of discharge of SNr neurons, most of them becoming irregular with bursts of spikes and pauses similar to those observed in the parkinsonian state (Degos et al., 2005).

Astrocytes are known to be dysfunctional in various neurodegenerative disorders. This dysfunction is often accompanied by astrogliosis characterized by astrocytic hypertrophy and an increase in the number of astrocytic processes (Seifert et al., 2006). Such astrogliosis has been shown to result from 6-OHDA lesioning of SNc, either locally or in distant basal ganglia nuclei (Henning et al., 2008). In the SNr, remote effects other than astrogliosis have never been considered. We chose to develop an immunofluorescent approach associated with deconvolution in order to improve resolution (Lavialle et al., 2011). We observed major changes in subthalamonigral synapses induced by 6-OHDA lesion. The increase of glutamatergic synapses number within the SNr has never been described before and can support the increase of extracellular gluramate measured within SNr following SNc 6-OHDAlesion, concurrently with the hyperactivity of STN neurons (Hassani et al., 1996; Windels et al., 2005). Interestingly, these changes were associated with a relocation of perisynaptic astrocyte processes leading to an increased number of tripartire synapses and an increase in the enwrapping area of these synapses objectivized by the perisynaptic phosphoezrin staining area. Within the tripartite synapse, the astrocyte exerts its functions mainly through its peripheral processes which should be considered as separate astrocytic compartments characterized by their content in phosphoezrin, their thin dimension and their high degree of plasticity. Phosphoezrin appears to play a crucial role in determining these properties of peripheral astrocytic processes interacting with the actin cytoskeleron (Derouiche et al., 2002; Derouiche and Frotscher, 2001). A similar induction of neuroglial plasticity

April 2015

Bosson et al.: SNr Astrocyte Adaptation to Parkinsonian State

by DA depletion has been described at the striatal glutamatergic synapses of MPTP-treated parkinsonian monkey with electron microscopic analyses (Villalba and Smith, 2011). This plasticity involves a larger spine volume, larger PSDs and larger presynaptic terminals indicative of increased synaptic plasticity in the residual spines of parkinsonian animals. It is associated with an increase in perisynaptic astrocyte ensheadhment likely to prevent glutamate spillover in the extracellular medium (Villalba and Smith, 2011). Within SNr, remodeling of the perisynaptic astrocyte ensheadhment may increase glutamate spillover. These observations are consistent with the increase in gap junction networking that may facilitate extracellular glutamate and potassium removal during synaptic activity (Pannasch et al., 2012).

Structural plasticity of astrocyte-neuron interactions is known to be associated with activity-dependent functional plasticity of both parmers (Theodosis et al., 2008). To investigare the impact of DA transmission blockade on the activity of SNr astrocytes, we used sagintal brain slices, in which the tonic spontaneous firing of the glutamatergic STN-SNr and the GABAergic GPe-SNr loops are preserved (Barat et al., 2012; Bosch et al., 2011). These loops are of major importance within the basal ganglia network and are also the node of the best known example of functional restoration of the network activity by STN-HFS. In the context of DA transmission blockade, we observed increases in the spontaneous calcium activity of individual astrocytes and in the global network synchrony. The increase in astrocytic calcium signal dynamics reflects a direct effect of DA transmission blockade on astrocytes since it was not affected by either blockade (TTX) or stimulation (STN-HFS) of neuronal activity. In contrast, the increase in synchrony directly depended on neuronal activity, as described in other brain structures (Aguadoet al., 2002). These concomitant activities were not artificially due to frequency increase induced by DA blockade since (i) complete similarity on calcium profiles were less likely when peaks are more numerous and (ii) TTX, CBX or STN-HFS disrupted synchronization without affecting frequency increase. Pharmacological DA blockade is known to enhance subchalamonigral and pallidonigral transmission (Aceves et al., 2011: Ibanez-Sandoval et al., 2006), leading to increases in GABA and glutamate levels within SNr. However. SNr astrocytic calcium activity partly depends on this GABA and glutamate release (Barat et al., 2012). The increase in the amounts of these transmitters is therefore probably responsible for the observed TTX-dependent synchronization of astrocyte calcium activity. Thus, the blockade of DA transmission directly affects the individual astrocyte excitability and indirectly synchronizes astrocytes through its neuronal impact. Conversely, biocytin diffusion showed that

681

gap junction channel-mediated communication is also increased during DA transmission blockade. This was accompanied by enrichment and reorganization of Cx43 expression pattern within astrocytes in this condition. Concurrently, a pronounced increase in Cx43 expression within SNr was described in a rotenone-induced model of Parkinson disease (Kawasaki et al., 2009) suggesting a reorganization of the astrocytic network during parkinsonian state that is already initiated in acute pharmacological DA disruption. This communication can be involved not only in astrocyte hyperexcitability through diffusion of ions or second messengers (Theis and Giaume, 2012) but also in neuronal network activity through ion homeostasis regulation (Pannasch et al., 2012), adding a further level of regulation of these neuroglial interactions. Astrocyte synchrony is inhibited by the gap-junction blocker CBX. This inhibitory effect could also be due to a nonspecific effect on several neuronal membrane conductances (Tovar et al., 2009). However, the fact that CBX did not alter other astrocyte excitability parameters or the proportion of active astrocytes (unlike TTX or STN-HFS) is in favor of a specific action. Therefore, the global astrocyte hyperexcitability parallels and partly results from the neuronal hyperactivity and may contribute to adaptation to pathophysiological processes. It may be involved in exchanging information between synaptic elements, modulating neuronal excitability through calcium dependent gliotransmitter release (Fiacco and McCarthy, 2004; Parri et al., 2001) or structural adaptation of tripartite synapses (Tanaka et al., 2013).

STN-HFS has been suggested to modulate pathological SNr neuronal activity through activation of glutamatergic subthalamonigral and GABAergic pallidonigral fibers (Bosch et al., 2011; Windels et al., 2000, 2005). Besides and consequently to these neuronal effects, STN-HFS regulates astrocyte hyperactivity by decreasing the proportion of active astrocytes and abolishing synchrony between active cells. As mentioned above, the blockade of DA transmission affects both the individual astrocyte excitability through a direct effect and the synchronization of astrocytes through an indirect neuronal impact. Rationally, STN-HFS only restores the neuronal-dependent level of excitability, with no effect on calcium activity parameters. This is consistent with an effect through glutamatergic and GABAergic fibers activation. These functional impacts of STN-HFS on astrocyte signaling, superimposed to the gluramate/GABA balance refinement, suggest an additional spatiotemporal dimension in regulating the overall SNr activity. For instance, attenuation of calcium activity has been shown to correlate with reduced astrocytic coverage of asymmetric synapses in hippocampus (Tanaka et al., 2013).

Our findings provide the first demonstration that SNr astrocytes are sensitive to the disruption of DA transmission, displaying short-term functional plasticity and long-term strucniral plasticity. One-hour acute DA transmission blocking induced rapid short-term functional adaptations of astrocyte but was probably too short to bring significant structural transformations. However, perisynaptic phosphoezrin tended towards a remodeling prefiguring the mid-term structural plasticity observed in lesioned animals. Astrocytic motility is known to be higher than its dendritic spines counterpart and morphological plasticity over minutes displayed process extension and retraction events that rely on actin-based cytoskeletal reorganization (Haber et al., 2006). This phenomenon is dependent on synaptic activity and promotes spine stability (Bernardinelli et al., 2014). Thus, short-term astrocytic process plasticity is highly dynamic and could be hard to detect with a static methodology such as immunostaining but may stabilize tripartite synapses in the long run when damage is permanent.

These structural and functional re-shaping occur in the main basal ganglia output nucleus whose activity is directly linked to certain motor symptoms associated with Parkinson's disease. Their beneficial or deleterious consequences should therefore be considered for understanding the development of the pathological hyperactivity in this structure and in its functional restoration by STN-HES. More generally, these consequences must be thoroughly investigated to improve our understanding of functional plasticity of neuroglial interactions within pathophysiological processes involving DA system disruption.

Acknowledgment

This work was supported by France Parkinson. We gratefully acknowledge Yasmina Saoudi for her technical assistance in image deconvolution, Dr. Fiona Hemming for correcting the english and Dr. Jean-Claude Platel for CalSignal software updates and for stimulating scientific discussions.

References

Aceves J, Rueda-Orozco PE, Hemandez R, Plata V, Ibanez-Sandoval O, Galanzga B, Bargas J. 2011. Depaminengic presynaptic modulation of nigral afferents: It role in the generation of rocurrent busting in substantia nigra pars roticulata neurons. Front Syst Neurosci 5:6.

Aguado F, Espinoza-Pamilia JF, Carmona MA, Soriano E. 2002. Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. J Neurosci 22:9430-9444.

Albin RL, Young AB, Penney JB. 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. Trends Neurosci 12:366-375.

Araque A, Parpura V, Saragin RP, Haydon PG. 1999. Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner. Trends Neurosci 22:208-215.

Barat E, Boisseau S, Bouyssieres C, Appaix F, Savarta M, Albrieux M. 2012. Subthalamic nucleus electrical itimulation modulates calcium activity of nigral astrocytes. PLoS One 7:e41793.

Bernardinelli Y, Randall J, Janett E, Nilemenko I, Konig S, Jones EV, Rores CE, Murai KK, Bochet CG, Holtmaat A, Muller D. 2014. Activity-dependent

structural plasticity of perigraphic astrocytic domains promotes excitatory synapse stability. Curr Biol 24:1679-1688.

Bosch C, Degos B, Deniau JM, Venance L. 2011. Substalamic nucleus high frequency stimulation generates a concomitant synaptic excitation-inhibition in substantia nigra pars resculate. J Physiol 509:19

Chevalier G, Deniau JM. 1990, Disinhibition as a basic process in the expression of stratal functions. Trends Neurosci 13:277-280.

Degos B, Deniau JM, Thierry AM, Glowinski J, Pezard L, Maurice N. 2005. Neuroloptic-induced cataleosy: electrophysiological mechanisms of functional recovery induced by high frequency stimulation of the subthalamic nucleus. J Neurosci 25:7687-7646.

DeLong MR 1990. Primate models of movement disorders of basel ganglia origin. Trends Neurosci 13:281-285.

Deniau JM, Mailly P, Maurice N, Charpler S. 2007. The past reticulate of the substants nigre: A window to basel ganglia output. Prog Brain Res 160:151-172.

Derouiche A, Anlauf E, Aumann G, Multistadt B, Lavialle M. 2002. Anatomical aspects of glia synapse interaction: The perisynaptic glial sheath consists of a specialized astrocyte compartment J Physiol Paris 96:177-182.

Derouche A, Frotscher M. 2001. Peripheral astrocyts processes: Monitoring by selective immunostaining for the actin-binding BRM proteins. Glia 36:330-341.

Facco TA, McCarthy KD. 2004. Intracellular actrocyte calcium waves in situ increase the frequency of sportaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. J Neurosci 24722-732.

Flacoo TA, McCarthy KD. 2008. Astrocyte calcium elevations: Properties, propagation, and effects on brain signaling. Glia 54:676-690.

Haber M, Zhou L, Murai KK. 2006. Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses. J Neurosci 26:8881–8891.

Hassani OK, Mouroux M, Feger J. 1996. Increased subthalamic neuronal activity after nigral dopaminergic lexion independent of disinhibition via the globus patilidus. Neuroscience 72:105–115.

Haydon PG. 2001. GUA: Listening and talking to the synapse. Nat Rev Neurosci 2:185-193.

Henning J, Stauss U, Wree A, Gimsa J, Rolfs A, Benecke R, Gima U. 2008. Differential astroglial activation in 6-hydraxydopamine models of Patrinson's disease. Neumoci Res 62:246-253

Hikosaka O. 2007. GABAergic output of the basal ganglia. Prog Brain Res 160:209-226.

Ibanez-Sandoval O, Hemandez A, Floran B, Galamaga E, Tapia D, Valdiosera R, Erlij D, Acwes J, Bargas J. 2006. Control of the subhalamic innervation of substantia high pairs whicelata by D1 and D2 dopamine receptors J Neurophysiol 95(1800–1811.

Kawasaki A, Hayashi T, Nakachi K, Trosko JE, Sugihara K, Kotake Y, Olita S. 2009. Modujation of connexin 43 in rotensne-induced model of Parkinson's disease. Neuroscience 160:51-68.

Lavialle M, Aumann G, Anlauf E, Prois F, Arpin M, Derouiche A. 2011. Structural plasticity of peringinaptic astrocyte processes involves etrin and metabotropic glutamate receptors. Proc Natl Acad Sci USA 108-12915-12919. Bosson et al.: SNr Astrocyte Adaptation to Parkinsonian State

Maurice N, Therry AM, Glowinski J, Denisu JM. 2003. Spontaneous and avoked activity of substantia nigra part mticulata neurons during highfrequency stimulation of the substalamic nucleus. J Neurosci 23:4929-9936.

Neoulion A, Coquetel A 2003. Dopamine: A key regulator to adapt action, emotion, motivation and cognition. Curr Opin Neurol 16 Suppl 2:53-59.

Pannasch U, Derangeon M, Chever O, Rouach N. 2012. Astroglial gap junctions shape reuronal network activity. Commun Integr Biol 5 249-254.

Parti HR, Gould TM, Crunelli V. 2001. Spontaneous astrocytic Ca^{2+} oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. Nat Neurosci 4: 903-812.

Peres G, Navarrete M, Acaque A. 2009. Tripartite synapses: Astrocytes process and control synaptic information. Trends Neurosci 32:421-431.

Patel JC, Dupuis A, Boisseau S, Villaz M, Albrieux M, Brocard J. 2007. Synchrony of spontaneous calcium activity in mouse neocoitex before synaptogenesis. Eur J Neutosci 25:920–928.

Porter JT, McCarthy KD, 1996. Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate miessed from graptic terminals. J Neurosci 16:5073-5081.

Preibisch S, Saafeld S, Tomancak P. 2009. Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. Bioinformatics 25:1443-1465.

Sasaki T, Kuga N, Namiki S, Matsuki N, Ikegaya Y. 2011. Locally synchronized astrosytes. Careb Cortex 2011 5.

Schools GP, Zhou M, Kimelberg HK. 2006. Development of gap junctions in hippocampal actropytes: evidence that whide cell electrophysiological phenotype is an intrinsic property of the individual cell. J Neurophysiol 96:1383-1392.

Seitert G, Schilling K, Steinhauser C. 2006. Astrogete dysfunction in neurological disorders: A molecular perspective. Nat Rev Neurosci 7:194-206.

Tanala M, Shih PY, Gomi H, Yoshida T, Nakai J, Ando R, Funichi T, Mikoshiba K, Semyanov A, Itohan S. 2013. Astrocytic Ca^{2n} signals are required for the functional integrity of tripartite synapses. Mol Brain &d.

Theis M, Giaume C. 2012. Connexin based intercellular communication and astrocyte heterogeneity. Brain Res 1487:88-98.

Theodosis DT, Poulain DA, Olet SHR. 2008. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. Physiol Rev 88:983–1008.

Tovar KR, Maher BJ, Westbrook GL. 2009. Direct actions of carbonoxolone on synaptic transmission and neuronal membrane properties. J Neurophysiol 102:974-978.

Ungentedt U. 1971. Adipsis and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-stratal dopamine system. Acta Physiol Scand Suppl 367:95-122.

Villalba 164, Smith Y. 2011. Neurogliai plasticity at striatal glutamatergic synapses in Parkinson's disease. Front Syst Neurosci 5/9.

Windels F, Bruet N, Poupard A, Urbain N, Chouvet G, Feuentein C, Savasta M. 2000. Effects of high frequency minulation of subfralamic nucleus on extracellular glutamete and GABA in substantia rigra and globus pallidue in the normal mat. Eur.J Neurosci 12:4141-4146.

Windels F, Carcenac C, Poupard A, Sevarda M. 2005. Pallidal origin of GABA milease within the substantia nigra pais reticulata during high-frequency stimulation of the substalamic nucleus. J Neurosci 25:5079-5086.

April 2015

7.2. Society for Neurosciences 2015



Résumé : La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative associée à une perte progressive des fonctions mnésiques et cognitives, qui font suite à des dysfonctions synaptiques. Ces dysfonctions sont en partie dues à la présence d'oligomères solubles du peptide amyloïde β (A β o). Chez l'homme ces oligomères sont déjà présents durant la phase asymptomatique de la maladie et semblent expliquer la perte synaptique et les dysfonctions caractéristiques de la maladie. Cependant, les mécanismes clés qui initient ce dysfonctionnement et cette perte synaptique restent inconnus. Il est actuellement admis que la synapse compte un 3^{ème} partenaire qui joue un rôle majeur dans l'intégrité structurale et fonctionnelle de la synapse, l'astrocyte. Grâce à leurs prolongements, les astrocytes peuvent enrober la plupart des synapses et contribuer activement aux changements morphologiques et fonctionnels observés durant l'activité synaptique. Cependant leur implication a été peu étudiée dans le contexte de la maladie d'Alzheimer.

Le but de ces travaux de thèse, était d'étudier de quelle manière Aßo modifie l'activité calcique astrocytaire et quelles peuvent en être les répercussions sur l'activité synaptique. Ainsi, nous avons mis en évidence sur tranche aigue d'hippocampes de souris, une hyperactivité calcique généralisée, au sein du réseau astrocytaire et au niveau des prolongements fins astrocytaires. Cette hyperactivité s'est révélée être dépendante d'un canal membranaire récemment identifié au niveau astrocytaire, le canal TRPA1. Cette hyperactivité calcique dépendante de TRPA1, se manifeste également très précocement, avant l'apparition de plaques amyloïdes, dans un modèle de souris transgénique pour la maladie d'Alzheimer. Au niveau neuronal, nous avons observé une augmentation de la transmission synaptique basale en présence d'Aßo. De manière intéressante, l'inhibition pharmacologique de TRPA1 permet de bloquer l'hyperactivité calcique induite par Aßo et de rétablir l'activité synaptique précédemment perturbée par l'Aßo. Dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que les astrocytes soient une cible privilégiée d'Aßo lors des phases asymptomatiques de la maladie d'Alzheimer, et que le blocage de l'hyperactivité calcique astrocytaire puisse garantir l'intégrité synaptique en présence d'Aßo.

Abstract: Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder associated with a progressive loss of cognitive functions following synaptic dysfunctions. These synaptic alterations are mainly due to oligomeric forms of amyloid β peptide (A β o). In humans, these oligomers are already present during the silent phase of the disease and seem to explain synaptic loss and synaptic dysfunctions. However, key mechanisms that initiate synaptic loss and synaptic dysfunctions remain unknown. It is now well established that there is a third component of the synapse, playing major role in morphological and functional synaptic integrity, the astrocyte. Thanks to their processes, astrocytes can enwrap most of synapses and actively participate to morphological and functional changes observed during synaptic activity. Still, their involvement in Alzheimer's disease is under-investigated.

The aim of these thesis works, was to evaluate how $A\beta o$ modify astrocytic calcium activity and what could be the repercussions on synaptic activity. We have observed on mice hippocampal acute brain slices a global calcic hyperactivity, within the astrocytic network and inside fine processes. This hyperactivity was dependent on a recently identified astrocytic channel, the TRPA1 channel. This TRPA1-dependent calcic hyperactivity shows up also very early, before amyloid plaques formation, in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. On the neuronal side, glutamatergic synaptic transmission was increased by $A\beta o$. Interestingly, pharmacological inhibition of TRPA1 could block astrocytic calcium hyperactivity and restore glutamatergic synaptic activity previously disturbed by $A\beta o$. Overall, our data suggests that the astrocyte is a frontline target of $A\beta o$ during the prodromal phase of Alzheimer's disease, and that blockade of astrocytic calcium hyperactivity could preserve synaptic integrity even when $A\beta o$ is applied.